

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 21 February 2001 (21.02.01)	Applicant's or agent's file reference D3-008PCT
International application No. PCT/JP00/03955	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International filing date (day/month/year) 16 June 2000 (16.06.00)	
Applicant NAKAJIMA, Toshihiro et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
29 November 2000 (29.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市御町1-1-1

関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
（PCT規則71.1）

発送日

（日.月.年）

10.04.01

出願人又は代理人
の書類記号

D3-008PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JPO0/03955

国際出願日

（日.月.年） 16.06.00

優先日

（日.月.年） 22.06.99

出願人（氏名又は名称）

株式会社ディナベック研究所

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 D3-008PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/03955	国際出願日 (日.月.年) 16.06.00	優先日 (日.月.年) 22.06.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N 15/867, C12N 5/10, C12N 7/01, C12P 21/02 // A61K 48/00		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I ☒ 国際予備審査報告の基礎
II ☐ 優先権
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV ☐ 発明の単一性の欠如
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ☒ ある種の引用文献
VII ☐ 国際出願の不備
VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.11.00	国際予備審査報告を作成した日 28.03.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9281

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-22	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: WO, 97/12622, A1 (SALK INST BIOLOGICAL STUDIES) 10.4月.1997

文献2: DULL, T. et al., J. Virol. (1998) Vol. 72, No. 11, p. 8463-8471

文献3: ZUFFEREY, R. et al., J. Virol. (1998) Vol. 72, No. 12, p. 9873-9880

請求の範囲1-22は、国際調査で引用された文献1-3により進歩性を有しない。文献1-3には、LTRからなる発現制御配列、スプライシング供与配列、免疫不全ウイルス由来のRREコア配列、スプライシング受容配列、外来遺伝子挿入部位の構成要素を5'側から3'側に向けて順に含むベクターが記載されており、また、スプライシング供与配列とRREコア配列の間にgag遺伝子が挿入されたベクターを用いて形質転換した細胞においてはLTRのプロモーター活性により挿入された遺伝子も発現しているものと認められる（文献2のFIG.1、文献3のFIG.3参照）から、文献1-3に記載されているベクターにおいて、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列の間の適当な位置に外来遺伝子挿入部位を設けることは、当業者が容易になし得ることである。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/29421, A1 「P, X」	25. 05. 00	12. 11. 99	13. 11. 98
WO, 00/29557, A1 「P, X」	25. 05. 00	12. 11. 99	13. 11. 98
WO, 99/31251, A1 「P, X」	24. 06. 99	11. 12. 98	12. 12. 97

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

PAT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6f
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPONRECEIVED
WITH THANKS

3. 1 2001

SHIMIZU PATENT
OFFICE

IMPORTANT INFORMATION

Date of mailing (day/month/year) 21 February 2001 (21.02.01)		
Applicant's or agent's file reference D3-008PCT		
International application No. PCT/JP00/03955	International filing date (day/month/year) 16 June 2000 (16.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
Applicant DNAVEC RESEARCH INC. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW
 EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
 National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
 OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
 National : AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, CH, CR, CU, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD,
 GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX,
 MZ, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Kiwa Mpay <i>KMP</i>
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

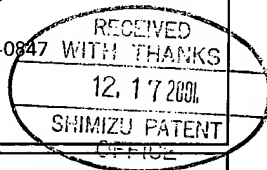
PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
 Kantetsu Tsukuba Bldg. 6f
 1-1-1, Oroshi-machi
 Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
 JAPON



Date of mailing (day/month/year) 07 December 2001 (07.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference D3-008PCT	
International application No. PCT/JP00/03955	International filing date (day/month/year) 16 June 2000 (16.06.00)
Applicant DNAVEC RESEARCH INC. et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AG,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU, ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,PL,PT,SD, SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Elliott PERETTI Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference D3-008PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03955	International filing date (day/month/year) 16 June 2000 (16.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/867, 5/10, 7/01, C12P 21/02 // A61K 48/00		
Applicant DNAVEC RESEARCH INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u> </u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 29 November 2000 (29.11.00)	Date of completion of this report 28 March 2001 (28.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-22	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: WO, 97/12622, A1 (Salk Inst. Biological Studies) 10 April 1997

Document 2: Dull, T. et al, J. Virol., Vol. 72, No. 11, 1998, pp. 8463-8471

Document 3: Zufferey R. et al., J. Virol., Vol. 27, No. 12, 1998, pp. 9873-9880

Based on the descriptions in documents 1-3 cited in the international search report, the inventions set forth in Claims 1-22 do not appear to involve an inventive step. Documents 1-3 describe a vector containing, in sequence from the 5' end to the 3' end, an expression signal sequence comprising an LTR, a splicing donor sequence, an RRE core sequence derived from an immunodeficient virus, a splicing receptor sequence, and a foreign gene insertion site as constitutional elements, and because this examination finds that in cells transformed using a vector in which a gag gene is inserted between a splicing donor sequence and RRE core sequence, a gene inserted by LTR promotor activation is also expressed (see document 2, Fig. 1 and document 3, Fig. 3), persons skilled in the art can easily prepare a foreign gene insertion site at a suitable location between the splicing donor sequence and the splicing receptor sequence in the vectors described in documents 1-3.

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO,00/29421.A1[P,X]	25 May 2000 (25.05.2000)	12 November 1999 (12.11.1999)	13 November 1998 (13.11.1998)
WO,00/29557.A1[P,X]	25 May 2000 (25.05.2000)	12 November 1999 (12.11.1999)	13 November 1998 (13.11.1998)
WO,99/31251.A1[P,X]	24 June 1999 (24.06.1999)	11 December 1998 (11.12.1998)	12 December 1997 (12.12.1997)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

PAT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6f
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 28 December 2000 (28.12.00)		
Applicant's or agent's file reference D3-008PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/03955	International filing date (day/month/year) 16 June 2000 (16.06.00)	
		Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
Applicant DNAVEC RESEARCH INC. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,DZ,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 28 December 2000 (28.12.00) under No. WO 00/78987

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPONRECEIVED
WITH THANKS

9. 25 2000

SHIMIZU PATENT
OFFICE

Date of mailing (day/month/year) 14 September 2000 (14.09.00)	
Applicant's or agent's file reference D3-008PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/03955	International filing date (day/month/year) 16 June 2000 (16.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
Applicant Dनावेक RESEARCH INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
22 June 1999 (22.06.99)	11/175646	JP	04 Augu 2000 (04.08.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Sean Taylor
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPON

RECEIVED

WITH THANKS

7. 27 2000

SHIMIZU PATENT
OFFICE

Date of mailing (day/month/year) 18 July 2000 (18.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference D3-008PCT	International application No. PCT/JP00/03955

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

DNAVEC RESEARCH INC. (for all designated States except US)
NAKAJIMA, Toshihiro et al (for US)

International filing date : 16 June 2000 (16.06.00)
Priority date(s) claimed : 22 June 1999 (22.06.99)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 30 June 2000 (30.06.00)
List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National : AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,
FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,
MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,
YU,ZA,ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer:

Shinji IGARASHI

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38



INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

P C T



国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP00/03955

RO105

		発送日（日．月．年） 27.06.00
出願人又は代理人 の書類記号 D3-008PCT		重 要 な 通 知
国際出願番号 PCT/JP00/03955	国際出願日（日．月．年） 16.06.00	優先日（日．月．年） 22.06.99
出願人（氏名又は名称） 株式会社ディナベック研究所		

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、27日06月00年 に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

P C T

00.06.28

受付

調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP00/03955

SA202

発送日（日．月．年）

27.06.00

出願人又は代理人
の書類記号

D3-008PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/03955

国際出願日（日．月．年）

16.06.00

優先日（日．月．年）

22.06.99

出願人（氏名又は名称）

株式会社ディナベック研究所

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日により受理したので通知する。

- 国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日により受理したので通知する。

27 日 06 月 00 年（受理の日）

2. ☒ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。
3. 国際調査報告の作成期間
国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。
4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本 (出願用) - 印刷日時 2000年06月16日 (16.06.2000) 金曜日 09時51分40秒

D3-008PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	

0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 10.05.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	D3-008PCT
I	発明の名称	2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター
II	出願人 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。	出願人である (applicant only) 米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	株式会社ディナベック研究所
II-4en	Name	DNAVEC RESEARCH INC.
II-6ja	あて名:	305-0856 日本国 茨城県 つくば市 観音台1丁目25番11号
II-6en	Address:	25-11, Kannonndai 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0856 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-1-4ja	氏名 (姓名)	中島 俊洋
III-1-4en	Name (LAST, First)	NAKAJIMA, Toshihiro
III-1-6ja	あて名:	561-0875 日本国 大阪府 豊中市 長興寺北3-13-31-303
III-1-6en	Address:	3-13-31-303, Chokojikita, Toyonaka-shi, Osaka 561-0875 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2 III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	中丸 健治 NAKAMARU, Kenji 140-0001 日本国 東京都 品川区 北品川 3-9-36 三共株式会社品川寮 206号室 206 Sankyo Co., Ltd. Shinagawa Ryo, 3-9-36, Kitashinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0001 Japan
III-2-5en	Address:	日本国 JP 日本国 JP
III-2-6 III-2-7	国籍(国名) 住所(国名)	
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2 III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	長谷川 護 HASEGAWA, Mamoru 305-0856 日本国 茨城県 つくば市 観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 c/o DNAMEC Research Inc., 25-11, Kannondai 1-chome, Tukuba-shi, Ibaraki 305-0856 Japan
III-3-5en	Address:	日本国 JP 日本国 JP
III-3-6 III-3-7	国籍(国名) 住所(国名)	
III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-4-2 III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja	右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	速水 正憲 HAYAMI, Masanori 601-8044 日本国 京都府 京都市 南区東九条明田町13-2 新島丸日光ハイツ710号 710 Shin Karasumaru Nikko Haitzu, 13-2, Higashikujo Aketa-cho, Minami-ku, Kyoto-shi, Kyoto 601-8044 Japan
III-4-5en	Address:	日本国 JP 日本国 JP
III-4-6 III-4-7	国籍(国名) 住所(国名)	

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年06月16日 (16.06.2000) 金曜日 09時51分40秒

D3-008PCT

III-5	その他の出願人又は発明者	
III-5-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-5-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-5-4ja	氏名(姓名)	井戸 栄治
III-5-4en	Name (LAST, First)	IDO, Eiji
III-5-5ja	あて名:	611-0021 日本国 京都府 宇治市 宇治野神 1-3 2
III-5-5en	Address:	1-32, Ujinokami, Uji-shi, Kyoto 611-0021 Japan
III-5-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-5-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名	代理人 (agent)
	下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	
IV-1-1ja	氏名(姓名)	清水 初志
IV-1-1en	Name (LAST, First)	SHIMIZU, Hatsushi
IV-1-2ja	あて名:	300-0847 日本国 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6階
IV-1-2en	Address:	Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan
IV-1-3	電話番号	0298-41-2001
IV-1-4	ファクシミリ番号	0298-41-2009
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	橋本 一憲
IV-2-1en	Name(s)	HASHIMOTO, Kazunori
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権 機構と特許協力条約の締約国である他の国





特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年06月16日（16.06.2000）金曜日 09時51分40秒

D3-008PCT

V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日から 15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権 主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年06月22日 (22.06.1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-175646	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権 証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	5	-
VIII-2	明細書 (配列表を除く)	37	-
VIII-3	請求の範囲	3	-
VIII-4	要約	1	abst. txt
VIII-5	図面	17	-
VIII-6	明細書の配列表	42	-
VIII-7	合計	105	
	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるク レジット及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディ スク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当す る納付済証を貼付した書 面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの 記録形式等の情報を記載 した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の 番号		

VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)
IX-1	提出者の記名押印	
IX-1-1	氏名 (姓名)	清水 初志
IX-2	提出者の記名押印	
IX-2-1	氏名 (姓名)	橋本 一憲

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

特許協力条約

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)



出願人代理人 清水 初志 あて名 〒 300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所	殿
--	---

PCT見解書

(法第13条)
(PCT規則66)

発送日 (日.月.年)	16.01.01
----------------	----------

出願人又は代理人 の書類記号	D3-008PCT	応答期間	上記発送日から 2 月以内
国際出願番号 PCT/J P 00/03955	国際出願日 (日.月.年) 16.06.00	優先日 (日.月.年) 22.06.99	
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N 15/867, C12N 5/10, C12N 7/01, C12P 21/02 // A61K 48/00			
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所			

- これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
- この見解書は、次の内容を含む。
 - ☒ 見解の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☒ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に応答することが求められる。
いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。
どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。
なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。
応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 22.10.01 である。

名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9281
---	--	---------

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-22	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

文献1 : WO, 97/12622, A1 (SALK INST BIOLOGICAL STUDIES) 10. 4月. 1997

文献2 : DULL, T. et al., J. Virol. (1998) Vol. 72, No. 11, p. 8463-8471

文献3 : ZUFFEREY, R. et al., J. Virol. (1998) Vol. 72, No. 12, p. 9873-9880

請求の範囲1-22は、国際調査で引用された文献1-3により進歩性を有しない。文献1-3には、LTRからなる発現制御配列、スプライシング供与配列、免疫不全ウイルス由来のRREコア配列、スプライシング受容配列、外来遺伝子挿入部位の構成要素を5'側から3'側に向けて順に含むベクターが記載されており、また、スプライシング供与配列とRREコア配列の間にgag遺伝子が挿入されたベクターを用いて形質転換した細胞においてはLTRのプロモーター活性により挿入された遺伝子も発現しているものと認められる(文献2のFIG. 1、文献3のFIG. 3参照)から、文献1-3に記載されているベクターにおいて、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列の間の適当な位置に外来遺伝子挿入部位を設けることは、当業者が容易になし得ることである。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書(PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/29421, A1 「P, X」	25. 05. 00	12. 11. 99	13. 11. 98
WO, 00/29557, A1 「P, X」	25. 05. 00	12. 11. 99	13. 11. 98
WO, 99/31251, A1 「P, X」	24. 06. 99	11. 12. 98	12. 12. 97

2. 書面による開示以外の開示(PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）



出願人代理人 清水 初志 股 あて名 〒 300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所		PCT 国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨 の決定の送付の通知書 (法施行規則第41条) (PCT規則44.1)
出願人又は代理人 の書類記号 D3-008PCT		発送日 (日.月.年) 03.10.00
国際出願番号 PCT/JPO0/03955	国際出願日 (日.月.年) 16.06.00	
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。 PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出 出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。 いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。 詳細については添付用紙の備考を参照すること。 どこへ 直接次の場所へ The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22)740.14.35 詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。 <input type="checkbox"/> 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。 <input type="checkbox"/> 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。</p> <p>4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。 優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。 出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。 国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。</p>
--

名称及びあて名 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特 許 庁 長 官 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9281
---	---	---------

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[PCT 18 条、PCT 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 D3-008PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/03955	国際出願日 (日.月.年) 16.06.00	優先日 (日.月.年) 22.06.99	
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

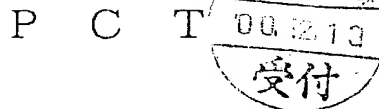
清水 初志

殿

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



国際予備審査請求書の の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

PCT/JP00/03955

PE402

発送日（日．月．年）

12.12.00

出願人又は代理人

の書類記号

D3-008PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/03955

国際出願日（日．月．年）

16.06.00

優先日（日．月．年）

22.06.99

出願人（氏名又は名称）

株式会社ディナバック研究所

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

29日11月00年

2. この受理の日は次に示す日である。

- ☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）
- ☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）
- ☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第11巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL.03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官

特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書



第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを前提として、特段の表示がある場合を除く、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

国際予備審査機関の名称			請求書の受理の日		
第 I 欄 国際出願の受取			出願人又は代理人の寄附記号 D3-008PCT		
国際出願番号 PCT/JPO0/03955		国際出願日 (日. 月. 年) 16. 06. 00		優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 22. 06. 99	
発明の名称 2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター					
第 II 欄 出願人					
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 株式会社ディナベック研究所 DNAVEC RESEARCH INC. 〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 25-11, Kannondai 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0856 JAPAN				電話番号: ファクシミリ 号: 加入電値番号:	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN			住所 (国名): 日本国 JAPAN		
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 中島 俊洋 NAKAJIMA Toshihiro 〒561-0875 日本国大阪府豊中市長興寺北3-13-31-303 3-13-31-303, Chokojikita, Toyonaka-shi, OSAKA 561-0875 JAPAN					
国籍 (国名): 日本国 JAPAN			住所 (国名): 日本国 JAPAN		
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 中丸 健治 NAKAMARU Kenji 〒140-0001 日本国東京都品川区北品川3-9-36 三共株式会社品川寮206号室 206 Sankyo Co., Ltd. Shinagawa Ryo, 3-9-36, Kitashinagawa, Shinagawa-ku, TOKYO 140-0001 JAPAN					
国籍 (国名): 日本国 JAPAN			住所 (国名): 日本国 JAPAN		
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が枝葉に記載されている。					

第 II 欄のつぎの記入

この第 II 欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

長谷川 護 HASEGAWA Mamoru

〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号

株式会社ディナベック研究所内

c/o DNAMEC Research Inc.,

25-11, Kannondai 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0856 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

(速水 正憲 HAYAMI Masanori

〒601-8044 日本国京都府京都市南区東九条明田町 1 3 - 2

新烏丸日光ハイツ 7 1 0 号

710 Shin Karasumaru Nikko Haitsu, 13-2, Higashikujo Aketa-cho,

Minami-ku, Kyoto-shi, KYOTO 601-8044 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

井戸 栄治 IDO Eiji

〒611-0021 日本国京都府宇治市宇治野神 1 - 3 2

(1-32, Ujinokami, Uji-shi, KYOTO 611-0021 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

☐ その他の出願人が他の続票に記載されている。

第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

電話番号：

0298-41-2001

ファクシミリ番号：

0298-41-2009

加入電信番号：

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi
10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori
〒300-0847 日本国茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg.6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi,
BARAKI 300-0847 JAPAN

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：＊

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20日経過後に延期されることを希望する（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)））。

（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。）

＊記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第V欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国）を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。：

第VI欄 附合材料

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による 額が添付されている。

国際予備審査機関書記入欄

受 領 未 受 領

1. 国際出願の翻訳文・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 枚

☐☐

2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書・・・・・・・・・・・・・・ 枚

☐☐3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・・・・・・・ 枚☐☐4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・・・・・・・ 枚☐☐

5. 書類・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 枚

☐☐

6. その他 (書類名を具体的に記載する) : 枚

☐☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

☒ 手数料計算用紙3. ☐ 包括委任状の写し☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を
貼付した書面4. ☐ 記名押印 (署名) に関する説明書☒ 国際事務局の口座への振込を証明する書面5. ☐ スクレオチド又はアミノ酸配列表
(フレキシブルディスク)2. ☐ 別個の記名押印された委任状6. ☐ その他 (書類名を具体的に記載する) :

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲



国際予備審査機関書記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 80.1 (b) の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5 により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局書記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2000年12月28日 (28.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/78987 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/867, 5/10, 7/01, C12P 21/02 // A61K 48/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03955
- (22) 国際出願日: 2000年6月16日 (16.06.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/175646 1999年6月22日 (22.06.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島俊洋 (NAKA-JIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒561-0875 大阪府豊中市長興寺北3-13-31-303 Osaka (JP). 中丸健治 (NAKA-MARU, Kenji) [JP/JP]; 〒140-0001 東京都品川区北品川3-9-36 三共株式会社 品川寮206号室 Tokyo (JP). 長谷川護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 速水正憲 (HAYAMI, Masanori) [JP/JP]; 〒601-8044 京都府京都市南区東九
- 条明田町13-2 新烏丸日光ハイツ710号 Kyoto (JP). 井戸栄治 (IDO, Eiji) [JP/JP]; 〒611-0021 京都府宇治市宇治野神1-32 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VECTOR FOR EXPRESSING TWO FOREIGN GENES

(54) 発明の名称: 2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター

(57) Abstract: A vector capable of expressing two foreign genes by using RRE sequence and controlling the ratio of the expression doses of these genes owing to the modification. This vector, which can be provided as a lentivirus vector based on SIV, is constructed by modifying a virus-origin expression regulatory sequence into another expression regulatory sequence so as to eliminate the dependency on the virus-origin protein. Although this vector has a packaging signal, it has been modified so that the risk of the occurrence of wild strains due to gene recombination is lowered and no virus structural protein is expressed. This vector is highly useful as a gene therapeutic vector with a need for transferring two genes while controlling the expression doses or expression dose ratio thereof.

[続葉有]

WO 00/78987 A1



(57) 要約:

RRE 配列の利用により 2 つの外來遺伝子を発現することができ、その改変により該 2 つの外來遺伝子の発現の量比を調製することが可能なベクターが提供された。該ベクターは SIV をベースとしたレンチウイルスベクターとすることができ、ウイルス由来の発現制御配列が他の発現制御配列に改変され、該ウイルス由来のタンパク質に対する依存性が解消されるように構築された。このベクターは、パッケージングシグナルを有するが、遺伝子組換えによる野生株の出現の危険が減少するように改変され、さらにウイルス構造タンパク質が発現しないように改変されている。このベクターは、2 種の遺伝子を、発現量や発現量比を制御して導入することが必要な遺伝子治療用ベクターとして極めて有用である。

- 1 -

明細書

2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター

技術分野

本発明は、外来遺伝子を発現させるためのベクターに関する。

背景技術

研究目的や遺伝子治療などにおいて外来遺伝子を標的細胞で発現させるために、遺伝子導入用ベクターが用いられている。このような場合に、2つの遺伝子を同じ標的細胞内で発現させることが望まれることがある。このようなことが可能になれば、例えば、治療用遺伝子と共に、選択用の遺伝子を発現させることで、治療用遺伝子を導入した標的細胞を選択的に増殖させたり死滅させたりすることができる。また、治療用遺伝子と共にマーカー遺伝子（例えば GFP など）を発現させることで、治療用遺伝子導入細胞の体内での動態をモニターすることが可能となる。さらに、レセプターや転写因子など、2種のサブユニットが複合体を形成して機能を持つタンパク質を発現させることも可能となる。

従来、2つの遺伝子を発現させるためのベクター系としては、複数のプロモーターを組み込んだ形のもの、1つのプロモーターと IRES 配列（Internal Ribosomal Entry Site）を組み合わせた形のもので報告されている。しかしながら、これらのベクターの発現特性は決して満足できるものではない。

例えば、複数のプロモーターを持つベクターは、プロモーター間の干渉により、どちらか一方のプロモーターからの発現しか効率良く起きないなどの問題点がある。また、1つのプロモーターと IRES を組み合わせたベクターは、IRES の 3' 側の遺伝子が、5' 側の遺伝子の 1/5～1/10 しか発現されないという問題がある。

発明の開示

本発明は、2つの外来遺伝子を同時に発現することができるベクターを提供することを課題とする。より詳しくは、RRE 配列の利用により2つの外来遺伝子を発現することができ、その改変により該2つの外来遺伝子の発現の量比を調整することが可能なベクターを提供することを課題とする。

該ウイルスベクターの好ましい態様として、ウイルス由来の発現制御配列が他の発現制御配列に改変され、該ウイルス由来のタンパク質に対する依存性が解消されているウイルスベクターを提供する。他の好ましい態様として、パッケージングシグナルを有するが、遺伝子組換えによる野生株の出現の危険が減少するように改変され、さらにウイルス構造タンパク質が発現しないように改変されたウイルスベクターを提供する。

本発明者らは、遺伝子治療の分野において、従来から用いられてきたヒト免疫不全ウイルス（HIV）と比較して、安全性が高いなど様々な利点を有するサル免疫不全ウイルス（SIV）において、RRE を利用した新規ウイルスベクターの構築を行った。

具体的には、まず、非病原性のアフリカミドリザル免疫不全ウイルスのクローンである SIVagmTY01 を基本とし、5' LTR 領域、RRE、CMV プロモーター、EGFP 遺伝子（またはベータガラクトシダーゼ遺伝子）、3' LTR を順に有するベクターをジーントランスファーベクターとして構築した。

ジーントランスファーベクターのベクター粒子へのパッケージングには、パッケージング細胞においてジーントランスファーベクターにトランスに作用するウイルス構造タンパク質が必要であるため、本発明者等は、次に、パッケージング細胞内においてウイルス構造タンパク質を供給するためのパッケージングベクターも構築した。即ち、パッケージング細胞内において、ウイルス外皮タンパク質（VSV-G）を発現させるためのベクターとウイルスコアタンパク質（gag）および

逆転写酵素 (pol) を発現させるためのベクターを構築した。

レンチウイルスの 5' LTR の転写活性は一般にウイルス由来の因子である Tat タンパク質の存在に依存している。そこで、本発明者等は、次に、構築したジーントランスファーベクターの Tat タンパク質に対する依存性を解消するため、およびより転写活性の強いプロモーター配列に置換することでベクター力価を高めるために、5' LTR のプロモーター配列である U3 領域を他のプロモーター配列に置換したジーントランスファーベクターを作製した。これにより Tat 非依存性のベクターを提供した。

レンチウイルスベクターにおいては、3' LTR 領域に含まれるプロモーター配列である U3 領域が、標的細胞中で逆転写される時に 5' LTR の U3 プロモーター領域へ組み込まれるため、標的細胞のゲノム内では、ジーントランスファーベクタープラスミドの 3' LTR 領域に含まれる U3 領域が、遺伝子発現に関与する 5' LTR の U3 プロモーターとなることが明らかとなっている。そこで標的細胞中で遺伝子発現に関与するプロモーターを U3 配列以外のプロモーターに置換しうるかを検討するため、ジーントランスファーベクターの 3' LTR の U3 領域を他のプロモーター配列へ置換したベクターを作成した。また、同時に標的細胞中で 5' LTR に存在するプロモーター配列を欠失させうるかを検討するため、ジーントランスファーベクターの 3' LTR の U3 領域を欠失させたベクターも作成した。

ジーントランスファーベクターのベクター粒子へのパッケージングには、ジーントランスファーベクター上に存在してシスに作用する因子であるパッケージングシグナルが必要であり、ベクターのパッケージングの効率を向上させることでベクター力価が高まることが予想される。このため、パッケージングシグナル配列により形成される構造を保持できるようにパッケージングシグナルを含む領域を可能な限り長くベクターへ組み込む必要があるが、その一方、ジーントランスファーベクターのパッケージングシグナルとパッケージングベクターとの配列の重複を最小限にすることで、両者の間でおこると考えられる組み換えによる野生

型ウイルスの出現頻度を最小限に抑制する必要がある。このため、ベクター系を構築するためには、ジーントランスファーベクターを効率的にパッケージングするために必要な最小限のパッケージングシグナル配列を正確に同定することが必要である。そこで、本発明者等は、5' LTR の下流の異なる長さの領域を含む DNA 断片をジーントランスファーベクターへ組み込んだ。これにより安全性およびパッケージング能をともに有するベクターを提供した。

次に、本発明者等は、2つの外来遺伝子を同時に発現することができるウイルスベクターの構築を行なった。Rev responsive element (RRE) はウイルス由来の Rev タンパク質の結合部位であり、RNA の核から細胞質への輸送に関与している。この RRE/Rev のシステムを利用して、スプライシングの効率を制御することで単一のプロモーターから同時に異なる2種のタンパク質を発現する系を構築することが可能であるかの検討を行なった。

まず、異なる2種のタンパク質の発現を RRE により制御できるかを検討するため、RRE の上流と下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子とベータガラクトシダーゼ遺伝子を組み込み、さらにルシフェラーゼ遺伝子の上流にスプライシングドナー配列を、RRE 配列の下流にスプライシングアクセプター配列をそれぞれ組み込んだベクターを構築した。このベクターからはスプライシングを受けた mRNA よりベータガラクトシダーゼタンパク質が、スプライシングを受けない mRNA よりルシフェラーゼタンパク質が発現されと考えられる。

また、単純に異なる2種の遺伝子が発現するだけでなく、その量比を RRE の配列を変えることで制御することが可能であるかを検討するため、6種の RRE 配列を組み込んだベクターを構築し、それぞれのベクターにおけるレポーター遺伝子の発現量を検討した。

その結果、RRE 配列を有するベクターより異なる2種の遺伝子が発現されうること、RRE 配列の置換により2種の遺伝子の発現効率を制御しうることが明らかとなった。また、パッケージングベクター非存在下においても異なる2種の遺伝子

が発現されることから、本遺伝子発現系は Rev タンパク質の存在に非依存的に 2 種の遺伝子を発現させうることが明らかとなった。

従来、RRE は Rev タンパクに依存的に作用すると考えられており、また、Rev/RRE による制御は、「全か無か」的なもので、Rev-ではすべてがスプライシングされた形となり、Rev+ではスプライシングされない形でとなると考えられていた。即ち、RRE 配列を変えてスプライシングの割合を変えるという例はなかった。従って、上記結果により RRE 配列の改変によってスプライシングの割合を変えることができることが初めて証明された。

さらに、本発明者等は、RRE を使用した 2 種遺伝子の同時発現系が、5' LTR 以外の種々のプロモーターを使用した発現系に対しても適用しうるかの検討を行なった。プロモーターとしては、他のヒトサイトメガロウイルス(CMV)由来のプロモーター、あるいは哺乳類細胞由来のプロモーター(EF1 α プロモーター)を使用した。その結果、5' LTR 以外のプロモーターを使用した場合においても、2 種の遺伝子が同時に発現されうることが明らかとなった。また、RRE 配列に依存した 2 種遺伝子の発現量制御も認められることが明らかとなった。これにより、RRE による 2 種遺伝子の同時発現系は種々のプロモーターを用いた発現系において幅広く使用されうることが明らかとなった。

また、レポーター遺伝子が RRE の上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかによりそれぞれの遺伝子の発現量がどの程度異なるかを検討した。ジーントランスファクターでルシフェラーゼとベータガラクトシダーゼの位置を相互に置換したベクターを作製し、両ベクターにおける 2 種のレポーター遺伝子の発現量を比較した。その結果、RRE の上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかによりレポーター遺伝子の発現量に差は認めらなかった。

本発明者等は、以上のように、RRE は配列の利用により、2 つの遺伝子を同時に発現することができ、また、用いる RRE 配列の相違により該 2 つの遺伝子の発現比を調節することが可能な新規ウイルスベクターを構築することに成功し、こ

れにより本発明を完成するに至った。

本発明は、より詳しくは、

(1) 2つの外来遺伝子を発現させるための下記 (a) から (f) ;

- (a) 発現制御配列、
- (b) スプライシング供与配列、
- (c) 第一の外来遺伝子挿入部位、
- (d) RRE コア配列、
- (e) スプライシング受容配列、
- (f) 第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を 5' 側から 3' 側に向けて順に含むベクターDNA、

(2) 2つの外来遺伝子を発現させるための下記 (a) から (f) ;

- (a) 発現制御配列、
- (b) スプライシング供与配列、
- (c) RRE コア配列、
- (d) 第一の外来遺伝子挿入部位、
- (e) スプライシング受容配列、
- (f) 第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を 5' 側から 3' 側に向けて順に含むベクターDNA、

(3) RRE コア配列がレトロウイルス由来である、(1) または (2) に記載のベクターDNA、

(4) RRE コア配列がレンチウイルス由来である、(1) または (2) に記載のベクターDNA、

(5) RRE コア配列が免疫不全ウイルス由来である、(1) または (2) に記載のベクターDNA、

(6) 発現制御配列が LTR である、(1) から (5) のいずれかに記載のベクターDNA、

(7) 発現制御配列が LTR 以外の発現制御配列を含む配列である、(1) から (6) のいずれかに記載のベクターDNA、

(8) LTR 以外の発現制御配列が、CMVL プロモーター、CMV プロモーター、および EF1 α プロモーターからなる群より選択される、(7) に記載のベクターDNA、

(9) スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレトロウイルス由来である、(1) から (8) のいずれかに記載のベクターDNA、

(10) スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレンチウイルス由来である、(1) から (8) のいずれかに記載のベクターDNA、

(11) スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列が免疫不全ウイルス由来である、(1) から (8) のいずれかに記載のベクターDNA、

(12) ベクターDNA 上の転写されうる領域内にパッケージングシグナルを含む、

(1) から (11) のいずれかに記載のベクターDNA、

(13) パッケージングシグナルがレトロウイルス由来である、(12) に記載のベクターDNA、

(14) パッケージングシグナルがレンチウイルス由来である、(12) に記載のベクターDNA、

(15) パッケージングシグナルが免疫不全ウイルス由来である、(12) に記載のベクターDNA、

(16) 完全な gag タンパク質が発現しないように構築されている (13) から

(15) のいずれかに記載のベクターDNA、

(17) gag タンパク質の翻訳開始コドンに変異を有する、(13) から (16) のいずれかに記載のベクターDNA、

(18) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された、(1) から (17) のいずれかに記載のベクターDNA、

(19) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された (12) から (17) のいずれかに記載のベクターDNA からの転写産物をウイルス粒子内部に含む

レトロウイルスベクター、

(20) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された(12)から(17)のいずれかに記載のベクターDNA からの転写産物をウイルス粒子内部に含むレンチウイルスベクター、

(21) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された(12)から(17)のいずれかに記載のベクターDNA からの転写産物をウイルス粒子内部に含む免疫不全ウイルスベクター、

(22) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された(12)から(17)のいずれかに記載のベクターDNA をパッケージング細胞に導入し、該細胞の培養上清から生産させたウイルス粒子を回収する工程を含む、ウイルスベクターの調製方法、に関する。

なお、本発明において「ウイルスベクター」とは、宿主内で外来遺伝子を発現させるための核酸分子をパッケージングしたウイルス粒子を指す。

本発明における、2つの外来遺伝子を発現させるためのベクターDNA は、構成要素として、(a) 発現制御配列、(b) スプライシング供与配列、(c) 第一の外来遺伝子挿入部位、(d) RRE コア配列、(e) スプライシング受容配列、(f) 第二の外来遺伝子挿入部位を順に含むベクターDNA である(但し、構成要素(c)と構成要素(d)は入れ替わっていても良い)。

このベクターDNA は、2つの外来遺伝子が挿入されると、スプライシングの有無により2つの外来遺伝子を同時に発現することができる。その原理は、下記の如くである。

2つの外来遺伝子が挿入された該ベクターDNA は、適当な宿主細胞に導入されると、その発現制御領域の活性化によりスプライシング供与配列、第一の外来遺伝子、RRE コア配列、スプライシング受容配列、第二の外来遺伝子を順に含む転写産物が生じる。この転写産物からは、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列の間でスプライシングが生じなければ、第一の外来遺伝子のみを翻訳

しうる mRNA が生じる。この mRNA にコードされる第 1 の外来遺伝子を翻訳したりポリソームは、第一の外来遺伝子のストップコドンにより RNA から離れるために、第 2 の遺伝子の翻訳は起きないと考えられる。一方、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列の間でスプライシングが生じた場合には、第一の外来遺伝子を含む領域が欠失することにより、第二の外来遺伝子のみを翻訳しうる mRNA が生じる。従って、該ベクターDNA が導入された宿主細胞においては、このスプライシングの有無により、2つの遺伝子産物を発現させることができる。

本発明のベクターDNA で用いられる発現制御配列の種類は、LTR に制限されない。ただし、後述のようにウイルスベクターとして使用するためには、ウイルスを標的細胞に感染後、逆転写されたウイルスゲノムが宿主の染色体に組込まれる機能を有することが必要である。LTR 以外の発現制御配列でこのような機能を保持するものとしては、例えば、実施例に示すような LTR とそれ以外のプロモーターとのキメラプロモーターが挙げられる。

本発明のベクターDNA に適用されるスプライシング供与配列およびスプライシング受容配列として、通常のスプライシング供与配列と受容配列の組み合わせを用いると、ほぼ 100%の効率でスプライシングが起きると考えられるので好ましくない。本発明においては、1種の RNA からスプライシングの差により2種以上のタンパク質が発現される場合に使われている配列が適している。一般に、レトロウイルスではそのような配列が多いことが知られている (A.B. Rabson and B. J. Graves, "Synthesis and Processing of Viral RNA", in "Retroviruses", p p.205-262 (1997) eds. J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。例としては、配列番号 : 76 に示す SIVagm TY01 のゲノム配列中 6964 位~8177 位までの領域が挙げられる。

本発明のベクターDNA において第一の外来遺伝子挿入部位は、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列との間に位置するようにする。第一の外来遺伝子の挿入部位は、目的遺伝子の翻訳を阻害しない適当な制限酵素部位を組み込

むことで構築できる。第二の外来遺伝子挿入部位は、スプライシング受容配列とポリA付加シグナルとの間に位置するように適当な制限酵素部位を組み込み作製することができる。RRE 配列は、第一の外来遺伝子の発現を阻害しない限り、第一の外来遺伝子の挿入部位の 5' 側に配置されていても 3' 側に配置されていてもよい。

第一の外来遺伝子と第二の外来遺伝子の組み合わせは特に制限されない。2 種の遺伝子の組み合わせについて有用と考えられる例を以下に示す。

a) 治療用遺伝子と薬剤耐性マーカー

治療用遺伝子導入細胞のみを *in vivo* で薬剤を用いて選択することで、導入細胞を増やしながら、非導入細胞を減らしていく。

b) 治療用遺伝子と増殖因子或いはそのレセプター

治療用遺伝子導入細胞の増殖を刺激することで、導入細胞のみを選択的に増殖させ、治療効果を高める。

c) 治療用遺伝子とホーミングレセプター

治療用遺伝子導入細胞が目的の部位に特異的に集まるように、ホーミングレセプターと共発現させる。例えば、AIDS 治療用遺伝子とリンパ節に対するホーミングレセプターなど。

d) 治療用遺伝子とマーカー遺伝子

治療用遺伝子導入細胞にマーカーをつけることで、導入細胞の動態、半減期を常時モニターすることが可能であると考えられる。もし、体外から検出できるタンパク質があれば、導入細胞を体外から常時モニターすることができると考えられる。

e) 2 種のサブユニットから構成されるタンパク質の発現

種々にタンパク質がヘテロダイマーを形成していることが明らかとなっているが、そのようなタンパク質を発現させることができるので、従来にくらべ治療用遺伝子の選択の幅が広がる。

f) 相互作用する2種遺伝子の発現

リガンドとレセプター、酵素とその基質、シグナル伝達分子とそのレセプターなどを発現させる。例えば、増殖因子とそのレセプターを同時発現させれば、遺伝子導入細胞の数を飛躍的に増やすことができる。

g) 相乗効果を持つ2種遺伝子の発現

種々のシグナル伝達系では、例えば、2種のリガンドによる刺激で相乗効果を示すといったように、複数のシグナル伝達系の活性化により相乗効果が認められることが多い。そのような効果を持つ2種の遺伝子の発現で、治療効果を高めることができると考えられる。

また、本発明のベクターDNAにおいては、そのRRE配列を変えることで、転写産物のスプライシングの効率を調節することができ、これにより宿主細胞内において発現する2つの遺伝子産物の量比を調節することができる。さらには、遺伝子産物の量自体を調節することも可能である。

例えば、図8に示すように、RRE配列としてc/SA配列やc/tr配列を用いれば第一の外来遺伝子の発現比率を高めることができ、逆に、RRE配列としてc/c配列やc/x配列を用いれば、第二の外来遺伝子の発現比率を高めることができる。また、図8に示すように、用いるRRE配列の違いにより、外来遺伝子の発現量自体を変化させることができる。外来遺伝子の発現量の調節には、様々な利点が存在する。例えば、遺伝子治療において2種の遺伝子産物を発現させる場合、両者の発現量の至適発現量が存在するが、量比を制御できることで、至適発現量に調節して治療効果を高めることができると考えられる。例えば、ヘテロダイマーでは、それぞれのサブユニットであるポリペプチドが1:1の量比で発現されれば、最も効率が良いと考えられ、また、酵素と基質であれば、酵素を少なくして基質を多くすれば効率が高まると考えられる。

本発明のベクターの生体への導入法は、例えば以下のようにして行うことができる。

a) DNA 単体での導入

筋細胞への投与は、DNA 単独で可能であるので、DNA をそのままベクターとして投与できると考えられる。

b) 非ウイルス系ベクターとしての投与

リポフェクトアミンやポリカチオニックリボソームなど、DNA と合成したトランスフェクション用の化合物との複合体の形で投与することが可能であると考えられる。

c) ウイルスベクターとしての投与

アデノウイルスなどの DNA 型ウイルスベクターへ組み込み、投与することも可能であると考えられる。

本発明のベクターDNA を用いて、これをパッケージングしたウイルス粒子を生産するためには、本発明のベクターDNA の転写されうる領域内にパッケージングシグナルを含むことが必要である。パッケージングシグナル配列により形成される構造を保持できるようにパッケージングシグナルを含む領域は、可能な限り長く該ベクターへ組み込む必要があるが、その一方、該ベクターDNA 上のパッケージングシグナルとパッケージングベクターとの間で起こる組み換えによる野生型ウイルスの出現頻度を抑制するためにはこれらベクター間の配列の重複を最小限にする必要がある。従って、本発明のベクターDNA の構築においては、パッケージング効率および安全性の両者を満足させるために、パッケージングに必要な配列を含むできる限り短い配列を用いることが好ましい。

パッケージングシグナルとしては、パッケージングベクターが導入された細胞によりパッケージングされる限り制限はなく、パッケージングベクターの種類に合わせて、レトロウイルス由来、レンチウイルス由来、免疫不全ウイルス由来のシグナルなどが用いられる。

例えば、実施例で用いた SIVagm 由来のパッケージングベクターの場合は、HIV ベクターはパッケージングされないため、用いられるシグナルの由来としては S

IV のみに制限されると考えられる。但し、HIV 由来のパッケージングベクターを用いた場合、SIV 由来のジーントランスファーベクターのパッケージングされるので、組換えウイルスの出現頻度を低下させるために、異なるレンチウイルス由来のジーントランスファーベクターとパッケージングベクターとを組み合わせ、ベクター粒子を形成させることが可能であると考えられる。この場合、霊長類のレンチウイルスの間の組み合わせ（例えば、HIV と SIV）であることが好ましい。

本発明のベクターDNA では、gag タンパク質が発現しないように改変されていることが好ましい。ウイルス gag タンパク質は、生体にとって異物として認識され、抗原性が現れる可能性がある。また、細胞の機能に影響を及ぼす可能性もある。従って、本発明のジーントランスファーベクターにおいては、gag タンパク質は発現しないように改変されていることが好ましい。

gag タンパク質を発現しないようにするためには、gag の開始コドンの下流に塩基の付加や欠失等によりフレームシフトするように改変することができる。また、gag タンパク質のコード領域の一部を欠失させることが好ましい。ウイルスのパッケージングには、gag タンパク質のコード領域の 5' 側が必要であるとされている。従って、本発明のジーントランスファーベクターにおいては、gag タンパク質コード領域の C 末側を欠失していることが好ましい。パッケージング効率に大きな影響を与えない範囲でできるだけ広い gag コード領域を欠失させることが好ましい。具体的には、gag コード領域の 150bp を残し、それより 3' 側を欠失させることができる。また、gag タンパク質の開始コドン（ATG）を ATG 以外のコドンに置換することも好ましい。置換するコドンは、パッケージング効率に対する影響が少ないものが好ましい。これにより構築されたパッケージングシグナルを有する本発明のベクターDNA を、適当なパッケージング細胞に導入することにより、ウイルスベクターを生産させることができる。生産させたウイルスベクターは、パッケージング細胞の培養上清から回収することができる。

パッケージング細胞に使われる細胞としては、一般的にウイルスを産生に使用

される細胞株であれば制限はない。ヒトの遺伝子治療用に用いることを考えると、細胞の由来としてはヒトまたはサルが適当であると考えられる。パッケージング細胞として使用されるヒト細胞株としては、例えば 293 細胞、293T 細胞、293 EBNA 細胞、SW480 細胞、u87MG 細胞、HOS 細胞、C8166 細胞、MT-4 細胞、Molt-4 細胞などが挙げられる。サル由来細胞株としては、例えば、COS1 細胞、COS7 細胞、CV-1 細胞、BMT10 細胞などが挙げられる。

HIV、SIV、および FIV などのレンチウイルスを基に作製した本発明のベクターは非分裂細胞に遺伝子を組み込むことができるため、既存のレトロウイルスベクターの遺伝子治療の限界を超えて、有効性を高めることへ貢献することが考えられる。即ち、本発明のベクターによって、非分裂細胞に多様な治療用遺伝子を染色体にインテグレーションすることが可能となる。

本発明により各種遺伝性疾患の遺伝子治療にも応用が可能である。対象となる疾患とその単一原因遺伝子として、ゴーシェ病においては β -セレブロシダーゼ（第 20 染色体）、血友病においては血液凝固第 8 因子（X 染色体）および血液凝固第 9 因子（X 染色体）、アデノシンデアミナーゼ欠損症においてはアデノシンデアミナーゼ、フェニルケトン尿症においてはフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（第 12 染色体）、Duchenne 型筋ジストロフィーにおいてはジストロフィン（X 染色体）、家族性高コレステロール血症においては LDL レセプター（第 19 染色体）、繊維性嚢胞症においては CFTR 遺伝子の染色体への組み込み等が考えられる。それら以外の複数の遺伝子が関与していると思われる対象疾患としては、アルツハイマー、パーキンソン病等の神経変性疾患、虚血性脳障害、痴呆、またエイズ等の難治性の感染症等が考えられる。エイズ患者の造血幹細胞を細胞外にとりだし in vitro で SIV ベースの本発明のベクターを作用させて、HIV の感染が起こる前に SIV に由来するゲノム転写を優勢にして、患者の体に戻し、HIV の転写因子を無効にする治療方法が考えられる。さらには、慢性疾患への応用として、虚血性心疾患においては VEGF ならびに FGF2 遺伝子、動脈硬化の遺伝子

治療に関しては、細胞増殖関連遺伝子、例えば細胞増殖因子 (PDGF、TGF- β 等)、Cyclin-dependent kinase 等の発現抑制への応用が可能となる。また糖尿病においては BDNF 遺伝子が候補となりうる。またこの方法により、遺伝子変異が癌化を引き起こす癌抑制遺伝子 p53 等の遺伝子を染色体に組み込む補充治療への応用、多剤耐性遺伝子を in vitro で骨髓由来造血幹細胞に導入した後、患者の血液に戻すことによって、癌の薬物治療の限界を超えた治療が可能となる。自己免疫疾患、例えば多発性硬化症、慢性関節リウマチ、SLE、糸球体腎炎等の遺伝子治療に関しては、T 細胞レセプター、各種接着因子 (例えば ICAM-1、LFA-1、VCAM-1、LFA-4 等)、サイトカインおよびサイトカインレセプター (例えば TNF、IL-8、IL-6、IL-1 等) 細胞増殖因子 (例えば PDGF、TGF- β 等)、作用因子 (例えば MMP 等) のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。アレルギー性疾患の遺伝子治療に関しては、IL-4、Fc ϵ R-I 等のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。臓器移植に関連する遺伝子治療に関しては、ヒト以外の動物ドナーの組織適合性抗原をヒト型に変えて異種移植の成功率を高める応用が可能となる。さらにはヒト ES 細胞の染色体に外来遺伝子を導入し、胚の段階で欠損する遺伝子を補って、体循環する酵素、成長因子等の不足を補充する治療が考えられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、サル免疫不全ウイルスクローン SIVagmTY01 を用いたレンチウイルスベクターシステムの概要を示す図である。

図 2 は、5' LTR のプロモーター配列である U3 領域を他のプロモーター配列に置換した SIVagm ジーントランスファーベクターの構造図である。

図 3 は、SIVagm ジーントランスファーベクターの 3' LTR の U3 領域を他のプロモーター配列へ置換したベクターの構造と、それが標的細胞で逆転写された結果生じると予想される、5' LTR の U3 プロモーター領域の構造を示した図である。

図4は、ジーントランスファーベクターのパッケージングシグナルの同定方法の概念図である。

図5は、ジーントランスファーベクターの gag タンパク質の翻訳開始コドンに対する点突然変異体を用いたパッケージングシグナルの同定方法の概念図である。

図6は、RRE による2遺伝子同時発現ベクターの構造図である。RRE の上流と下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子と β -ガラクトシダーゼ遺伝子が組み込まれ、更にルシフェラーゼ遺伝子の上流にスプライシングドナー配列を、RRE 配列の下流にスプライシングアクセプター配列がそれぞれ組み込まれている。ベクターからはスプライシングの有無により2種の mRNA が産生される。

図7は、さまざまな RRE 配列を有するベクターの構造図である。

図8は、プロモーターに5'LTRを持ち、さまざまな RRE 配列を有するベクターより発現される2種の遺伝子の発現量を測定した結果を示す。

図9は、グラフは、5'LTR 以外の種々のプロモーターを用いて構築した2遺伝子同時発現系における遺伝子発現を示す。プロモーターとしては、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)由来のプロモーター、あるいは哺乳類細胞由来のプロモーター(EF1 α プロモーター)を使用した。下段にベクターの構造図を示した。

図10は、SIVagm ジーントランスファーベクターで RRE6/s (6964-7993) 配列を含む2遺伝子同時発現ベクターについて、ルシフェラーゼと β -ガラクトシダーゼの位置を相互に置換したベクターを作製し(下段)、両ベクターにおける2種のレポーター遺伝子の発現量を比較した結果を示す(グラフ)。

図11は、SIVagm SIN ベクターにより、G2-M 期で停止状態の293T細胞(A)およびレチノイン酸により分化を誘導した SH-SY5Y 細胞(B)に対して EGFP 遺伝子を導入し、蛍光顕微鏡で発現を確認した写真である。

図12は、SIVagm ベクターによりヒト PBMC に対して EGFP 遺伝子を導入し、フローサイトメーターで発現を解析した図である。縦軸が細胞数、横軸が EGFP の発現量に対応する蛍光強度を表す。M1 の範囲に含まれる細胞が EGFP 陽性であ

り、図中の数値が EGFP 陽性率 (%) を示す。

図 1 3 は、SIVagm ベクターによりヒト PBMC 由来 T 細胞に対して EGFP 遺伝子を導入し、フローサイトメーターで発現を解析した図である。

図 1 4 は、SIVagm ベクターによりヒト骨髓血由来 CD34 陽性細胞に対して EGFP 遺伝子を導入し、フローサイトメーターで発現を解析した図である。EGFP と PE 系統の 2 カラーにより解析を行い、EGFP 陽性率を求めた。R2 の領域に含まれる細胞が EGFP 陽性であり、図中の数値が EGFP 陽性率 (%) を示す。

図 1 5 は、SIVagm ベクターによりヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に対して EGFP 遺伝子を導入し、フローサイトメーターで発現を解析した図である。

図 1 6 は、SIVagm ベクターによりカニクイザル骨髓由来 CD34 陽性細胞に対して EGFP 遺伝子を導入し、フローサイトメーターで発現を解析した図である。

図 1 7 は、SIVagm ベクターにより EGFP 遺伝子を導入したヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウスに移植し、5 週および 6 週後の末梢血中におけるヒト細胞の割合をフローサイトメーターで解析した図である。PE 標識抗ヒト CD45 抗体によってマウス末梢血白血球中のヒトリンパ球を染色し、EGFP との 2 カラーによる解析を行った。UL、UR、LL、LR はそれぞれ各図の左上、右上、左下、右下の領域を表し、UL と UR の領域に含まれる細胞が CD45 陽性であり、UR の領域に含まれる細胞が CD45 陽性かつ EGFP 陽性である。図中の数値は、各領域に含まれる細胞数の全細胞数に対する割合 (%) を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] SIVagm ベクターの構築と性能の確認

非病原性のサル免疫不全ウイルスクローンである SIVagmTY01 を用いて、新規レンチウイルスベクターの構築を下記のように行った。図 1 にベクターシステム

の概要を示す。

ベクター系の構築には、非病原性のアフリカミドリザル免疫不全ウイルスのクローンである SIVagmTY01 を用いた。ヌクレオチドの番号は以下すべてウイルス RNA の転写開始点を +1 として表記した。SIVagmTY01 を組み込んだプラスミドとしては pSA212 (J.Viol., vol.64, pp307-312, 1990) を用いた。また、ライゲーション反応は、すべて Ligation High (東洋紡) を用い添付説明書に従って行った。

a. パッケージングベクターの構築

まず、vif と tat/rev の第 1 エクソンを含む領域(5337-5770)に相当する DNA 断片をプライマー 1F (配列番号: 1) と 1R (配列番号: 2) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR により得た。PCR プライマーに制限酵素部位である EcoRI 部位を付加することで DNA 断片の 3' 端に EcoRI 部位をもつ断片を調製した。PCR 断片を BglII と EcoRI により切断した後、アガロースゲル電気泳動と Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) で精製した。以上のようにして得た DNA 断片と、gag/pol 領域をコードする DNA 断片 (XhoI (356) 部位から BglII (5338) 部位までを含む) を、pBluescript KS+ (Stratagene) の XhoI-EcoRI 部位へライゲーションした。次に、Rev responsive element (RRE) と tat/rev の第 2 エクソンを含む領域(6964-7993)に相当する DNA 断片を PCR で増幅した。上記の PCR 断片と同様にプライマー 2F (配列番号: 3) と 2R (配列番号: 4) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR により 3' 端に NotI 部位を付加し、EcoRI と NotI で切断後に精製し、gag-tat/rev を組み込んだ pBluescript KS+ の EcoRI-NotI 部位へ組み込んだ。

さらに、スプライシングドナー (SD) 部位を含む DNA 断片を合成した (配列 3F (配列番号: 5) と 3R (配列番号: 6))。合成時に 5' 端に XhoI 部位、3' 端に SalI 部位を付加し、上記の gag-RRE-tat/rev を組み込んだ pBluescript KS+ の XhoI 部位へ組み込んだ。得られたプラスミドを XhoI と NotI により切断し、SD~tat/rev を含む断片を精製し、pCAGGS (Gene, vol.108, pp193-200, 1991) の EcoRI

I 部位に XhoI/NotI リンカー（配列 4F（配列番号：7）と 4R（配列番号：8））を組み込んだプラスミドの XhoI-NotI 部位へ組み込んだ。以上の方法により得られたプラスミドをパッケージングベクター（pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev）として使用した。

b. ジーントランスファーベクターの構築

SIVagmTY01 由来の 5' LTR 領域（8547-9053+1-982、5' 端に KpnI 部位、3' 端に EcoRI 部位を付加）はプライマー 5-1F（配列番号：9）と 5-1R（配列番号：10）を、RRE(7380-7993、5' 端に EcoRI 部位、3' 端に SacII 部位を付加）はプライマー 5-2F（配列番号：11）と 5-2R（配列番号：12）を、3' LTR(8521-9170、5' 端に NotI と BamHI 部位、3' 端に SacI 部位を付加）はプライマー 5-3F（配列番号：13）と 5-3R（配列番号：14）をそれぞれ用いて pSA212 をテンプレートとした PCR により増幅した。pEGFPC2（Clontech）由来の CMV プロモーター領域と EGFP をコードする領域（1-1330、5' 端に SacII 部位、3' 端に NotI 部位と BamHI 部位と翻訳ストップコドン（付加）をプライマー 6F（配列番号：15）と 6R（配列番号：16）を用いて pEGFPC2 をテンプレートとした PCR により増幅した。4 種の PCR 断片をそれぞれ制限酵素 KpnI と EcoRI、EcoRI と SacII、BamHI と SacI、SacII と BamHI 切断した後に精製し、pBluescript KS+ の KpnI-SacI の間に 5' LTR→3' LTR→RRE と CMV プロモーター-EGFP の順にライゲーションして組み込んだ（pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVFE GFP/WT3' LTR）。レポーター遺伝子として β -ガラクトシダーゼを使用する場合には、上記のようにして PCR により調製した 5' LTR 領域と 3' LTR 領域を含む DNA 断片をそれぞれ制限酵素 KpnI と EcoRI、NotI と SacI で切断した後に精製し、pBluescript KS+ の KpnI-EcoRI と NotI-SacI にそれぞれ組み込んだプラスミド（pBS/5' LTR.U3G2/WT3' LTR）NotI 部位に pCMV-beta（Clontech）の β -ガラクトシダーゼをコードする領域を含む NotI 断片（820-4294）を組み込んだ（pBS/5' LTR.U3G2/beta-gal/WT3' LTR）。次にプラスミド pBS/5' LTR.U3G2/beta-gal/WT3' LTR の EcoRI-NotI 部位に、プライマー 7-1F（配列番号：17）と 7-1R（配列番号：18）を用いて PCR により増幅した。

号:18)を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR により増幅した RRE 配列(6964-8177、5' 端に EcoRI 部位、3' 端に NotI 部位を付加)を組み込んだ(pBS/5' LTR.U3G2/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTR)後に RRE 配列を EcoRI と NheI で切り出し、プライマー7-2F(配列番号:19)と 7-2R(配列番号:20)を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR により増幅した RRE 配列(7380-7993、5' 端に EcoRI 部位、3' 端に NheI 部位を付加)を組み込んだ。以上の方法で得られたプラスミド(pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/beta-gal/WT3' LTR)を NheI と SmaI で切断し平滑末端化した後、pEGFPN2(Clontech)由来の CMV プロモーター領域(8-592、AseI-NheI 断片を平滑末端化)を組み込んだ(pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR)。平滑末端化反応はすべて Blunting High(東洋紡)を使用して添付説明書に従って行った。プラスミド pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfEGFP/WT3' LTR と pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR をそれぞれ KpnI-SacI で切断して 5' LTR-3' LTR を含む DNA 断片を調製し、pGL3Control(Promega)ベクターの KpnI-SacI 部位へ組み込み、ジーントランスファーベクター(pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-galまたは EGFP/WT3' LTR)として使用した。パッケージングシグナルの同定には、pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR プラスミドの 5' LTR を KpnI と EcoRI で切り出し、種々の長さの異なる領域を含む DNA 断片をプライマー8F(配列番号:21)と 8-1R から 12R(配列番号:22 から 33)を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した 12 種の DNA 断片を、KpnI-EcoRI 部位へ組み込んだベクターを使用した。

また、gag ポリペプチドをコードする領域にフレームシフトを導入したベクターはプライマー8F(配列番号:21)と 8-3R(配列番号:24)を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を KpnI-EcoRI 部位へ組み込んだベクターの EcoRI 部位へ 8-FSF(配列番号:34)と 8-FSR(配列番号:35)を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を組み込むことで得た。gag ポリペプチドの翻訳開始コドン(ATG)に対して点突然変異を導入したベクターはプライマー8

F(配列番号:21)と 8-PMR1 から 9(配列番号:36 から 44)を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を KpnI-EcoRI 部位へ組み込んだベクターの EcoRI 部位へ 8-FSF(配列番号:34)と 8-FSR(配列番号:35)を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を組み込むことで得た。

ベクターの性能確認の一般的な方法は以下の通りである。293T 細胞を 6 ウェルのプラスチックプレート(住友ベークライト)へ 1 ウェルあたり 5×10^5 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中(37°C、10%炭酸ガス存在下)で 48 時間培養する。培養後に培養液を 1 ウェルあたり 800 μ l の OptiMEM に置換してトランスフェクションに使用する。DNA 量は 1 ウェルあたり 300ng のジーントランスファーベクターと 600ng のパッケージングベクターと 100ng の VSV-G 発現ベクター(pHCMV-G, Methods in Cell Biology, vol.43, pp99-112, 1994)を使用する。DNA を 100 μ l の OptiMEM に溶解後に 6 μ l の PLUS reagent を加えて攪拌後 15 分室温で静置する。DNA と PLUS reagent との混合液に、100 μ l の OptiMEM で希釈した 4 μ l の LIPOFECTAMINE を添加して攪拌後さらに 15 分室温で静置する。以上の方法により調製した DNA と LIPOFECTAMINE との複合体を含む溶液を 6 ウェルプレートで培養している 293T 細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベーター中(37°C 10%炭酸ガス存在下)で 3 時間培養する。培養後 1 ウェルあたり 1ml の 20%非動化ウシ胎児血清を含む D-MEM を添加し、炭酸ガスインキュベーター中で 37°C 10%炭酸ガス存在下で 12 時間培養した後、1 ウェルあたり 2ml の 10%非動化ウシ胎児血清を含む D-MEM に培地交換し、さらに 24 時間培養した後に細胞の培養上清を 0.45 μ m のポアサイズのフィルター(DISMIC-25CS フィルター、ADVANTEC)で濾過してアッセイに使用する。

濃縮ストックを調製する場合には、まず 293T 細胞を 15 センチメートルのプラスチックプレート(住友ベークライト)へ 1 プレートあたり 2.5×10^6 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中(37°C、10%炭酸ガス存在下)で 48 時間培養後に培養液を 1 ウェルあたり 10ml の OptiMEM に置換してトランスフェ

- 22 -

クションに使用する。DNA 量は 1 プレートあたり $6\text{ }\mu\text{g}$ のジーントランスファーベクターと $3\text{ }\mu\text{g}$ のパッケージングベクターと $1\text{ }\mu\text{g}$ の VSV-G 発現ベクター (pHC MV-G) を使用する。DNA を 1.5 ml の OptiMEM に溶解後に $40\text{ }\mu\text{l}$ の PLUS reagent を加えて攪拌後 15 分 室温で静置する。DNA と PLUS reagent との混合液に、 1 ml の OptiMEM で希釈した $60\text{ }\mu\text{l}$ の LIPOFECTAMINE を添加して攪拌後さらに 15 分 室温で静置する。以上の方法により調製した DNA と LIPOFECTAMINE との複合体を含む溶液を 6 ウェルプレートで培養している 293T 細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベーター中で 37°C 10% 炭酸ガス存在下で 3 時間 培養する。培養後 1 プレートあたり 10 ml の 20% 非動化ウシ胎児血清を含む D-MEM を添加し、炭酸ガスインキュベーター中で 37°C 10% 炭酸ガス存在下で 12 時間 培養した後培地を 1 プレートあたり 20 ml の 10% ウシ胎児血清を含む D-MEM に交換し、さらに 24 時間 培養した後に培養上清を $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のポアサイズのフィルターで濾過後に、セントリプラス YM-100(Amicon)を用いて 4°C 、 3000 g の条件で 170 分 遠心し限外濾過を行うことで 100 倍 に濃縮する。濃縮後のサンプルはマイナス 80°C で保存してアッセイに使用する。

これにより調製した SIVagm ウイルスベクターは、ヒト細胞株 293T などを用いて遺伝子導入効率を決定することができる。また、後述のアフィジコリン処理 (G1-S 期での停止) や X 線照射 (G2-M 期での停止) により、特定の細胞周期における遺伝子導入効率を検討することもできる。

また、SIVagm ベクターの導入実験を各種細胞を用いて試行すれば、SIVagm ベクターがより生理的状态に近い細胞に対しても同様に遺伝子導入しうるかを決定することができる。そのような細胞としては、例えば、ヒト神経芽細胞株 RBTM1 と SH-SY5Y 細胞を全トランス型レチノイン酸処理により分化誘導させたものや、ラット初代培養脳細胞 (後述) などか挙げられる。

【実施例 2】 5'LTR の改変

レンチウイルスの 5'LTR の転写活性は一般にウイルス由来の因子である Tat タ

ンパク質の存在に依存している。そこで、Tat に対する依存性を解消するためと、より転写活性の強いプロモーター配列に置換することでベクター力価を高めるために、5' LTR のプロモーター配列である U3 領域を他のプロモーター配列に置換した SIVagm ジーントランスファーベクターを作製した (図 2)。

5' LTR のキメラプロモーターへの置換は、以下のようにして行った。5' LTR の TATA ボックスの下流～gag 領域 (9039-9170+1-982) を含む断片をプライマー 9-1F から 3F (配列番号: 45 から 47) と 9R (配列番号: 48) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で増幅した。また、CMVL プロモーター (pCI (Promega) 由来、1-721)、CMV プロモーター (pEGFPN2 (Clontech) 由来、1-568)、EF1 アルファプロモーター (pEF-BOS (Nucleic Acids Research, vol.18, p5322, 1990) の 2240-2740)、CA プロモーター (pCAGGS の 5-650) を含む断片をそれぞれプライマー 10-1F (配列番号: 49) と 10-1R (配列番号: 50)、10-2F (配列番号: 51) と 10-2R (配列番号: 52)、10-3F (配列番号: 53) と 10-3R (配列番号: 54)、10-4F (配列番号: 55) と 10-4R (配列番号: 56) を用いてそれぞれ pCI、pEGFPN2、pEF-BOS、pCAGGS をテンプレートとした PCR で増幅した。増幅後に 5' LTR を含む断片と上記の各プロモーターを含む断片とを混合し、それぞれのプロモーターの 5' 側のプライマー (10-1F (配列番号: 49)、10-2F (配列番号: 51)、10-3F (配列番号: 53)、10-4F (配列番号: 55)) と、5' LTR の 3' 側のプライマー (9R) を添加し、更に 10 サイクルの PCR 反応を行うことで、4 種のプロモーターと 5' LTR とのキメラプロモーターの DNA 断片を得た。得られた DNA 断片は、ジーントランスファーベクター (pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR) の Kpn I-EcoRI 部位に組み込んだ (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/CMV.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/EF1 アルファ.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/CAG.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR)。

[実施例 3] 3' LTR の改変

レンチウイルスベクターにおいては、3' LTR 領域に含まれるプロモーター配列

である U3 領域が、標的細胞中で逆転写される時に 5' LTR の U3 プロモーター領域へ組み込まれるため、標的細胞のゲノム内では、ジーントランスファーベクタープラスミドの 3' LTR 領域に含まれる U3 領域が、遺伝子発現に関与する 5' LTR の U3 プロモーターとなることが明らかとなっている (図 3)。そこで標的細胞中で遺伝子発現に関与するプロモーターを U3 配列以外のプロモーターに置換しうるかを検討することが可能な、SIVagm ジーントランスファーベクターの 3' LTR の U3 領域を他のプロモーター配列へ置換したベクターを作成した (図 3)。また、同時に標的細胞中で 5' LTR に存在するプロモーター配列を欠失させるかを検討することが可能な、SIVagm ジーントランスファーベクターの 3' LTR の U3 領域を欠失させたベクターも作成した。

3' LTR の U3 プロモーター配列の改変と欠失は、以下のように行った。3' LTR の U3 を含まない DNA 断片をプライマー 11F (配列番号: 57) と 11R (配列番号: 58) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で増幅した。また、U3 領域を他のプロモーターへ置換した 3' LTR はプライマー 12-1F から 3F (配列番号: 59 から 61) と 12R (配列番号: 62) を用いて、実施例 2 に記載の方法で得られたキメラプロモーターを組み込んだベクタープラスミドである pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/EF1 アルファ.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/CAG.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR をそれぞれテンプレートとして PCR で増幅した。PCR により得られた DNA 断片は SalI と SacI で切断後に精製し、pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT3' LTR の SalI-SacI 部位へ組み込んだ (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/3LTRdeltaU3、pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/CMVL.R、pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/EF1 アルファ.R、pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/CAG.R)。

【実施例 4】 パッケージングシグナルの同定

ジーントランスファーベクターのベクター粒子へのパッケージングには、ジーントランスファーベクター上に存在してシスに作用する因子であるパッケージン

グシグナルとパッケージングベクターより供給されトランスに作用するタンパク質が必要である。ベクターのパッケージングの効率を向上させることでベクター力価が高まることが予想されるため、パッケージングシグナルの配列により形成される構造を保持出来るようにパッケージングシグナルを含む領域を可能な限り長くベクターへ組み込む必要がある。一方、ジーントランスファーベクターのパッケージングシグナルとパッケージングベクターとの配列の重複を最小限にすることで、両者の間でおこると考えられる組み換えによる野生型ウイルスの出現頻度を最小限にする事が可能となることから、パッケージングに必要な最小領域を同定することが必要である。従って、ベクター系を構築するためには、ジーントランスファーベクターを効率的にパッケージングするために必要な最小限のパッケージングシグナル配列を正確に同定することが必要である。パッケージングシグナルの同定は、図4に示す方法で行ないうる。

gag 領域により発現されるポリペプチドがパッケージングに必要であるのか、あるいは gag 領域の DNA 配列自身が必要であるかについては、図5に示すような変異を導入したジーントランスファーベクターと野生型ジーントランスファーベクターのパッケージング効率を比較することで明らかにしうる。

〔実施例5〕 新規2種遺伝子の同時発現系の開発

Rev responsive element (RRE) はウイルス由来の Rev タンパク質の結合部位であり、RNA の核から細胞質への輸送に関与している。この RRE/Rev のシステムを利用して、スプライシングの効率を制御することで単一のプロモーターから同時に異なる2種のタンパク質を発現する系を構築することが可能であるかを検討した。

まず、異なる2種のタンパク質の発現を RRE により制御できるかを検討するため、図6に示すベクターを構築した。すなわち RRE の上流と下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子と β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込み、更にルシフェラーゼ遺伝子の上流にスプライシングドナー配列を、RRE 配列の下流

にスプライシングアクセプター配列をそれぞれ組み込んだベクターを構築した。図 6 に示すようにこのベクターからはスプライシングの有無により 2 種の mRNA が産生される事が予想される。すなわちスプライシングを受けた mRNA より β -ガラクトシダーゼタンパク質が、スプライシングを受けない mRNA よりルシフェラーゼタンパク質が発現されることが考えられる。また、単純に異なる 2 種の遺伝子を発現するだけでなく、その量比を RRE の配列を変えることで制御することが可能であるかを検討するため、6 種の RRE 配列を組み込んだベクターを構築し、それぞれのベクターにおけるレポーター遺伝子の発現量を検討した。

2 遺伝子発現系を組み込んだベクターと RRE 配列の活性検討用ベクターの構築は、以下のように行った。ルシフェラーゼ、あるいは EGFP をコードする遺伝子断片の 5' と 3' の両端に EcoRI 部位を付加した DNA 断片をプライマー 13-1F (配列番号: 63) と 13-1R (配列番号: 64)、13-2F (配列番号: 65) と 13-2R (配列番号: 66) を用い pSP-luc+(Promega) と pEGFPN2(Clontech) をそれぞれテンプレートとした PCR により増幅した。

プラスミド pBS/5' LTR.U3G2/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTR を KpnI と EcoRI で切断し、プライマー 14F (配列番号: 67) と 14R (配列番号: 68) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR により得た 5' LTR を含む DNA 断片を組み込んだ (pBS/5' LTR.U3Met-/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTR)。プラスミド pBS/5' LTR.U3Met-/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTR を EcoRI と NheI で切断して RRE 配列を切り出し、種々の RRE 配列を含む DNA 断片を 3 種のプライマー (15-1F (配列番号: 69) と 15-2F (配列番号: 70)) と、3 種のプライマー (15-1R (配列番号: 71)、15-2R (配列番号: 72)、15-3R (配列番号: 73)) を組み合わせて pSA212 をテンプレートとした PCR により得た 6 種の DNA 断片を EcoRI と NheI、あるいは EcoRI と XbaI で切断後に精製した DNA 断片へ置換した。得られたプラスミドの EcoRI 部位に、PCR により調製したルシフェラーゼ、あるいは EGFP をコードする遺伝子断片を EcoRI で切断後に精製したものを組み込み RRE 配列の活性検討用のアッセイに使

- 27 -

用した (図 7)。

レポーター遺伝子の位置の置換は、以下のように行った。RRE6/s(6964-7993) 配列を含むプラスミド pBS/5' LTR.U3Met-/RRE6/s/beta-gal/WT3' LTR を NheI と SalI で切断し、 β -ガラクトシダーゼをコードする領域を含む断片を切り出した後、ルシフェラーゼをコードする領域を含む NheI-XhoI 断片 (pSP-luc+由来、17-1723)を組み込んだ(pBS/5' LTR.U3Met-/RREc/s/luc+/WT3' LTR)。次に pBS/5' LTR.U3Met-/RREc/s/luc+/WT3' LTR を EcoRI 切断後に平滑末端化し、pCMV-beta(Clontech)の β -ガラクトシダーゼをコードする領域を含む NotI 断片 (820-4294)を平滑末端化後に精製したものを組み込み (pBS/5' LTR.U3Met-/beta-gal/RREc/s/luc+/WT3' LTR) アッセイに使用した。平滑末端化反応はともに Blunting High (東洋紡) を使用して添付説明書に従って行った。

プラスミド pBS/5' LTR.U3Met-/RREc/s/beta-gal/WT3' LTR を KpnI と EcoRI で切断して 5' LTR をプライマー 16F (配列番号:74)と 16R (配列番号:75)を組み合わせ pSA212 をテンプレートとした PCR により得た DNA 断片を組み込んだ (pBS/5' LTR.U3G3/RREc/s/beta-gal/WT3' LTR)。

pBS/5' LTR.U3G3/RREc/s/beta-gal/WT3' LTR の EcoRI 部位に、PCR により調製した EGFP をコードする遺伝子断片を EcoRI で切断後に精製したものを組んだ後に、KpnI-SacI で切断して 5' LTR-3' LTR を含む DNA 断片を調製し、pGL3Control(Promega)ベクターの KpnI-SacI 部位へ組み込み in situ での 2 遺伝子発現系の検定に用いた。

このようにして構築したジーントランスファーベクターを後述のように 293T 細胞にトランスフェクションし、 β -ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、図 8 のグラフに示すように、RRE 配列を有するベクターより異なる 2 種の遺伝子が発現されうること、RRE 配列の置換により 2 種の遺伝子の発現効率を制御しうることが明らかとなった。また、パッケージベクター非存在下においても異なる 2 種の遺伝子が発現されることから、本遺伝子

発現系は Rev タンパク質の存在に非依存的に 2 種の遺伝子を発現させることが明らかとなった。

〔実施例 6〕 2 種遺伝子の同時発現系のプロモーターに対する特異性

上記実施例ではプロモーターは SIVagmTY01 の 5' LTR プロモーターを使用していたが、RRE を使用した 2 種遺伝子の同時発現系が、5' LTR 以外の種々のプロモーターを使用した発現系に対しても適用しうるかを検討した。プロモーターとしては、他のヒトサイトメガロウイルス (CMV) 由来のプロモーター、あるいは哺乳類細胞由来のプロモーター (EF1 α プロモーター) を使用した (図 9 下段)。

その結果、図 9 のグラフに示すように 5' LTR 以外のプロモーターを使用した場合においても、2 種の遺伝子が同時に発現されることが明らかとなった。また、RRE 配列に依存した 2 種遺伝子の発現量制御も認められることが明らかとなった。従って RRE による 2 種遺伝子の同時発現系は種々のプロモーターを用いた発現系において幅広く使用されることが明らかとなった。

〔実施例 7〕 レポーター遺伝子の位置効果

レポーター遺伝子が RRE の上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかによりそれぞれの遺伝子の発現量がどの程度異なるかを検討した。SIVagm ジーントランスファーベクターで RRE6/s (6964-7993) 配列を含むベクターについて、ルシフェラーゼと β -ガラクトシダーゼの位置を相互に置換したベクターを作製し (図 10 下段)、両ベクターにおける 2 種のレポーター遺伝子の発現量を比較した。

その結果、図 10 のグラフに示すように RRE の上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかでレポーター遺伝子の発現量に差は認められなかった。すなわち RRE 配列を用いた 2 種遺伝子の同時発現系は、特に種々のレセプターや転写因子など 1 : 1 のモル比で複合体を形成する事で機能を有するタンパク質の発現に有用であることが明らかとなった。

〔実施例 8〕 SIN ベクター (Self Inactivating Vector) の性能確認

実施例 3 において作製した ジーン ト ラ ンス フ ァ ー ベ ク タ ー

pGL3C/CMV.L.U3G2/RREc/s/ CMV β -gal/3' LTR Δ U3 は 3' LTR の U3 領域を欠失しているため、標的細胞から全長のベクター mRNA が転写されることを防止する Self Inactivating Vector (SIN ベクター) として安全性が向上していると考えられる。

SIN 化により遺伝子導入効率に変化しうるかを検討するために、293T 細胞に対する SIVagm SIN ベクターの導入力価を、同一条件で作製した従来の野生型 3' LTR をもつ SIVagm ベクターの場合と比較した。その結果、導入力価は従来型で 2.4-2.8 TU / ml、SIVagm SIN ベクターで 2.5-2.9 TU / ml となり、従来型の導入力価を 100%とした場合、SIVagm SIN ベクターでは 105%であった。

さらに、放射線照射により細胞周期を停止した 293T 細胞およびレチノイン酸により終末分化を誘導した SH-SY5Y 細胞への SIVagm SIN ベクターによる EGFP 遺伝子の導入を試みた。細胞周期を停止した 293T 細胞における EGFP の発現を蛍光顕微鏡で観察したところ、高い効率で遺伝子の発現が認められた (図 1 1 上段)。また、レチノイン酸処理した SH-SY5Y 細胞については、神経細胞に分化していると考えられる、突起を伸長した細胞において EGFP の発現が確認された (図 1 1 下段)。

これらのことから、遺伝子導入効率は SIN 化により低下しないことが明らかになった。

〔実施例 9〕 末梢血リンパ球および CD34 陽性細胞への SIVagm SIN ベクターによる遺伝子導入

CD34 陽性細胞は、近年、造血幹細胞を含む分画として注目されている (Blood, vol.87, pp1-13, 1996)。したがって、CD34 陽性細胞への遺伝子導入が可能になれば、造血幹細胞に対する遺伝子導入、およびそこから分化するすべての血液細胞への遺伝子導入が可能になると考えられる。そこで、SIVagm SIN ベクターによってヒト末梢血由来単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC)、ヒト T 細胞、ヒト骨髓由来および臍帯血由来 CD34 陽性細胞、カニクイザル骨髓

由来 CD34 陽性細胞に遺伝子を導入できるかを検討した。

PBMC の分離は、あらかじめ 0.5M EDTA 200 μ l を入れておいたシリンジにヒト末梢血液 10ml を採血し、Lymphoprep Tube (Nycomed) を添付説明書に従って用いることにより行った。分離した細胞は、96 穴のプラスチックカルチャープレートに $2-2.5 \times 10^5$ / well でまき、RPMI 1640 培地 (Gibco BRL、5% 非働化ウシ血清を含む) 中、37°C 5%CO₂ で培養した。T 細胞への誘導は、分離した PBMC を RPMI 1640 5%FCS、PHA (SIGMA) 5mg / ml で 3 日間培養し、IL2 (シオノギ) 40U / ml を加えてさらに 3 日間培養することにより行った (Current Protocols in Immunology: 6.16.4)。ヒト骨髓由来および臍帯血由来 CD34 陽性細胞は、PureCell 社の凍結細胞を添付説明書に従って解凍し、96 穴のプラスチックカルチャープレートに $2-2.5 \times 10^5$ / well でまき、IMDM (Gibco BRL) 10% BIT9500 (StemCell) 中で培養した。カニクイザル (3-7 歳齢、雌、平均体重 3.0kg) 骨髓由来 CD34 陽性細胞は、96 穴のプラスチックカルチャープレートに $2-2.5 \times 10^5$ / well でまき、a(-)MEM (SIGMA) 10%非働化ウシ血清 (国際試薬レハツイン・プレミアグレード Lot. RB51901) 中で培養した。

ベクターによる遺伝子の導入は、以下のように行った。まず、培養液より上清を一部除去し、実施例 1 に記載の方法で濃縮しておいたベクター pGL3C/CMV.L.U3G2/RREc/s/ CMVF EGFP/3' LTR Δ U3 (力価 $1-7 \times 10^9$ TU / ml) を重層して全量を 50 μ l とした。その後、PBMC については、200G、32°Cにて 30 分間遠心し、37°C 5% CO₂ で 3 時間培養し、培地 200 μ l を重層、48 時間培養した。CD34 陽性細胞では、ベクター重層後に遠心を行わず、37°C 5% CO₂ で 3 時間培養し、培地 200 μ l を重層、48 時間培養した。

EGFP 遺伝子の導入はフローサイトメトリーによって確認した。まず、培養した細胞をカルチャーウェルより回収し、PBS 3%FCS 0.05%NaN₃ で洗浄後、PE (フィコエリスリン) 標識抗 CD3 抗体、PE 標識抗 CD14 抗体、PE 標識抗 CD19 抗体 (Becton Dickinson) を用いて添付説明書に従い表面抗原を染色した。染色後、細胞を洗

浄し、PBS 1%PFA で固定し、フローサイトメーターにかけた。

その結果、ヒト PBMC では、m.o.i. 90 において 51.8%の細胞が EGFP 陽性であった。EGFP 発現細胞の割合は m.o.i. 依存的に上昇したが、m.o.i. 36 において EGFP 陽性率が 45%になり、それ以上の m.o.i.でも EGFP 陽性率は約 50%以上にはあがらなかった。また、濃縮していないベクターでは、遺伝子導入は認められなかった(図 1 2)。ヒト PBMC から誘導した T 細胞では、ベクター感染 48 時間後の解析で m.o.i. 50 において 14.5%の細胞で EGFP の発現が認められたが、濃縮していないベクターでは、遺伝子導入は認められなかった(図 1 3)。ヒト骨髓由来および臍帯血由来 CD34 陽性細胞それぞれに対し m.o.i. 30 で遺伝子導入を行ったところ、骨髓細胞では 26% (図 1 4)、臍帯血細胞では 11% (図 1 5) の細胞で EGFP が発現していた。サル骨髓由来 CD34 陽性細胞では、m.o.i. に依存した導入率の上昇がみられ、m.o.i. 100 における EGFP 発現率は 58%であった(図 1 6)。

以上の結果から、SIVagm SIN ベクターにより PBMC、T 細胞、骨髓および臍帯血由来 CD34 陽性細胞に対し高い効率での遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。

[実施例 1 0] SIVagm SIN ベクターにより遺伝子導入された CD34 陽性細胞による造血系の再構築

NOD / SCID マウスは、IDDM 糖尿病マウスである NOD / Lt マウスと免疫不全マウスである SCID マウスの戻し交雑により作成されたマウスで、SCID マウスの T 細胞、B 細胞欠損状態に加え、NK 細胞、マクロファージ、補体の活性の低下が認められる複合免疫不全マウスである (J. Immunol., vol.154, pp180-191, 1995)。日本クレアより、この動物の系統である NOD / Shi-scid Jic オス 6 週令を購入し、2 週間飼育後に実験に使用した。

NOD / SCID マウスに対し多分化能を持つヒト細胞を移植すると、マウス体内で造血系の再構築が行われヒト血液細胞が体内を循環ようになる(Nat. Med.,

vol.2, pp1329-1337, 1996)。この系を利用し、遺伝子導入後の CD34 陽性細胞による造血系の再構築と再構築後の血液細胞における EGFP 発現を検討した (SCID re-populating cell アッセイ)。

まず、NOD / SCID マウス オス 8 週令に対し、半致死量の放射線を照射 (300rad)した。放射線照射には日立 MBR-1520R を使用し、照射条件は管電圧 150kv、管電流 20mA、0.5 Al, 0.1 Cu フィルターとした。放射線照射後数時間以内に、尾静脈より移植細胞をマイJECTター (テルモ 29Gx1/2"針付きシリンジ) を用いて注入、移植した。

移植のための細胞には、ヒト臍帯血由来 CD34 細胞 (PureCell) を使用した。細胞の培養、および SIVagm SIN ベクターによる遺伝子導入は実施例 9 に記載した方法で行い、m.o.i. 100 で感染を行った。ベクター感染後 6 時間培養した後細胞を回収し、IMDM (Gibco BRL) で洗浄、 $1-3 \times 10^6$ / ml で IMDM に浮遊させ、動物 1 頭あたり 1×10^5 / 100 μ l を移植した。

移植後の動物は、P3 実験施設内安全キャビネットにおいて無菌的に飼育した。実験は 1 群 10 頭のマウスを用い、4 群に分けて行った。28 頭に遺伝子導入細胞を移植、6 頭に無処理の細胞を移植し、6 頭は移植を行わずに飼育した。全 40 頭の動物のうち、6 週後まで生存したのは 25 頭であり、生存率は 6 割であった。ヒト細胞の生着が成立した個体は生存個体中 5 頭で、遺伝子導入細胞を移植した動物が 2 頭、無処理の細胞を移植した動物が 3 頭であった。

4 週から 6 週にかけて末梢血液を採取した。尾静脈をカミソリで切断し、末梢血液 50-100 μ l をとり、0.5M EDTA 10 μ l と混和し、凝血を防止した。採取した血液に蒸留水 700 μ l を加え数回ピペッティングして赤血球を破壊し、2xPBS 700 μ l を加えて混和し、遠心 (5000rpm 1 分間) して末梢血中全白血球を回収した。回収した白血球を 50 μ l の PBS 3% FCS 0.05% NaN₃ に懸濁し、PE 標識抗ヒト CD45 抗体 (Coulter) 2 μ l を加え、氷上で 30 分間反応させ、PBS 3% FCS 0.05% NaN₃ で 2 回洗浄し、PBS 1% PFA で固定後フローサイトメーターで解析した。解析は

2カラーで行い、マウス白血球中のヒト CD45 陽性細胞とその中の EGFP 発現細胞を見た。

その結果、ヒト CD34 陽性細胞を移植したマウス末梢血では、白血球の 10～50% の細胞においてヒト CD45 の発現が認められた。SIVagm SIN ベクターにより EGFP 遺伝子を導入したヒト CD34 陽性細胞を移植したマウスでは、末梢白血球中のヒト CD45 陽性細胞の 20%において EGFP の発現が認められた (図 17)。

[共通の操作]

本実施例において、共通する操作を下記 (1) から (7) に示した。

(1) 細胞の培養

ヒト胎児腎細胞由来細胞株 293T 細胞 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, vol.90, pp839 2-8396, 1993) は、10%非動化ウシ胎児血清を含む D-MEM (GibcoBRL) で培養した。また、細胞周期を停止させるためには、293T 細胞をアフィジコリン処理 (Calbiochem、最終濃度 20 μ g/ml で 48 時間処理、G1-S での停止)、あるいは X 線による照射 (200 rad/分で 20 分照射後に 48 時間培養、G2-M での停止) のいずれかの処理を行なう。ヒト神経芽細胞株 RBTM1 と SH-SY5Y 細胞 (Cancer Research, vol.58, pp2158-2165, 1998) は 10%非動化ウシ胎児血清を含む RPMI1640 (GibcoBRL) 培地で培養する。神経細胞への分化誘導は全トランス型レチノイン酸処理 (Sigma、最終濃度 5 μ mol/ml で 7 日間培養) で行なう。培養はすべてプラスチックプレート (住友ベークライト) で行なう。

(2) ラット初代培養脳細胞培養の調製のための一般的な方法

ラット初代培養脳細胞は 5%非動化ウシ胎児血清と 5%非動化ウマ血清 (Gibco BRL) を含む D-MEM (Gibco BRL) で培養する。初代細胞の調製は以下の方法で行なう。妊娠 18 日目の SD ラットをジエチルエーテルによる深麻酔後に腋窩動脈放血を行い安楽死させる。死亡確認後に開腹を行い、胎児を含む子宮を摘出する。子宮より無菌的に摘出した胎児の頭部より脳を摘出し作業液 (50%D-MEM、50%BS (Gibco BRL)、ペニシリン 5X10⁴ U/L (Gibco BRL)、ストレプトマイシン 50

mg/L (Gibco BRL) を含む) 中に静置し、実体顕微鏡下で脳幹部分と大脳半球の髄膜を除去する。脳組織を作業液により 1 回洗浄した後手術用メスを用いて細切り、ババイン処理 (ババイン (Worthington Biochem) 1.5 U/ ml、システイン (ナカライ) 0.2 mg/ ml、ウシ血清アルブミン (Sigma) 0.2 mg/ ml、グルコース (和光) 5 mg/ ml、DNase I (Gibco BRL) 0.1 mg / ml を含む溶液中で転倒攪拌、32°C で 30 分間処理) 後、ピペッティング操作により細胞を懸濁し、遠心操作 (1200rpm で 5 分間) により細胞を回収する。回収した脳細胞は、5 % 非動化ウマ血清、5 % 非動化ウシ胎児血清、ペニシリン 5×10^4 U/L、ストレプトマイシン 50mg/L を含む D-MEM による洗浄を 2 回行なう。洗浄後に細胞数を計測し、1 ウェルあたり $1 - 3 \times 10^6$ 個の細胞密度でポリ-L-リジンコートした 6 ウェルプレート (セルタイト PL、住友ベークライト) にまき、炭酸ガスインキュベーター中 (37°C、5 % CO₂ 存在下) で培養する。

(3) トランスフェクション

トランスフェクションはすべて LIPOFECTAMINE PLUS (Gibco BRL) を用いて添付説明書に従って行った。293T 細胞を 6 ウェルのプラスチックプレート (住友ベークライト) へ 1 ウェルあたり 5×10^6 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中 (37°C、10% 炭酸ガス存在下) で 48 時間培養した。トランスフェクションの 30 分前に培養液を 1 ウェルあたり 800 μ l の OptiMEM (Gibco BRL) に培地交換し培養を続けた。トランスフェクションに使用する DNA 量は 1 ウェルあたり 300ng のジエントランスファーベクターと、600ng のパッケージングベクターまたは空のベクターを使用した。DNA を 100 μ l の OptiMEM に溶解後に 6 μ l の PLUS reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌後 15 分室温で静置した。DNA と PLUS reagent (Gibco BRL) との混合液に、100 μ l の OptiMEM で希釈した 4 μ l の LIPOFECTAMINE を添加して攪拌後さらに 15 分室温で静置した。以上の方法により調製した DNA と LIPOFECTAMINE との複合体を含む溶液を 6 ウェルプレートで培養している 293T 細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベ-

ター中 (37°C 10%炭酸ガス存在下) で 3 時間培養した。培養後 1 ウェルあたり 1 ml の 20%非動化ウシ胎児血清を含む D-MEM を添加し、炭酸ガスインキュベーター中 (37°C 10%炭酸ガス存在下) で 48 時間培養した後に β -ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイに使用した。

(4) β -ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイ

β -ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイはそれぞれ Luminescent beta-gal detection kit II(Clontech)と Luciferase Assay System(Promega)を用いて添付説明書に従って行った。サンプルとしては DNA をトランスフェクションした 293T 細胞を 1 ウェルあたり 800 μ l の Reporter Lysis Buffer で溶解し、12000g、4°C で 5 分間遠心後に上清を分取したものを細胞溶解液として使用した。 β -ガラクトシダーゼアッセイでは細胞溶解液 20 μ l と基質液 100 μ l を混合した後、室温で 1 時間静置後にルミノメーター(AutoLumat LB953,berthold)で 10 秒間発光強度を測定した。ルシフェラーゼアッセイでは細胞溶解液 20 μ l と基質液 100 μ l を混合後、すみやかにルミノメーター (AutoLumat LB953,berthold) で 10 秒間発光強度を測定した。すべてのアッセイで、それぞれサンプルについて 3 検体測定し平均値と標準偏差を求めた。

(5) PCR

PCR はすべて PCR Supermix High Fidelity(Gibco BRL) を用いて行った。反応液 90 μ l に、基質として 1 μ g のテンプレート DNA、プライマーとして 2 種の合成オリゴヌクレオチドを最終濃度 1 nmol/ml になるように添加し、蒸留水で 100 μ l になるように全容量を調整し、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) を用いて反応を行った。サンプルを 94°C で 1 分間反応後に、94°C 30 秒、55°C 30 秒、68°C 90 秒の反応を 10 サイクル行い、最後に 68°C で 5 分間の反応を行った。反応液は Wizard DNA Clean-up System(Promega)で精製した後に目的の制限酵素で切断し、1%低融点アガロースゲル(SeaPlaque GTG agarose, FMC Boichem、TAE バッファーに溶解)で分離後に目的のサイズの DNA 断

片をゲルより切り出し Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)で精製した後にライゲーション反応に使用した。

(6) SIVagm ベクターによる遺伝子導入の一般的方法

標的となる 293T 細胞は 6 ウェルのプラスチックプレート (住友ベークライト) へ 1 ウェルあたり 5×10^5 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中 (37°C 、10%炭酸ガス存在下) で 48 時間培養後にアッセイに使用する。標的細胞にはベクターを含む溶液にポリブレン (Sigma) を最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ になるように添加した溶液を重ねる事でベクターの導入を行なう。ベクター感染後 48 時間後に標的細胞を Beta-Gal Staining Kit(Invitrogen)を用いて X-gal を基質とした染色を行い、倒立顕微鏡 (DMIRB(SLE)、ライカ) で検鏡して標的細胞でのベクターガラクトシダーゼの発現を検出する。X-gal により青色に染色された細胞の数を定量し、293T 細胞 1 細胞に対してベクターガラクトシダーゼを発現させるベクター量を 1 Transducing Unit(TU)として算出する。

(7) 抗体による遺伝子導入細胞の染色のための一般的な方法

ベクターを感染後 48 時間で、標的細胞を PBS (日研生物医学研究所) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (和光) を含む PBS により室温で 30 分間固定する。固定後に PBS で 5 分間 3 回の洗浄を行い、その後 2%正常ヤギ血清 (Gibco BRL) を含む PBS で室温 1 時間のブロッキングを行なう。一次抗体としては、ラット脳細胞の分化ニューロンに対しては抗 MAP-2 モノクローナル抗体 (マウス IgG, BOEHRINGER MANHEIM) を $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度に、 β -ガラクトシダーゼ導入細胞に対しては抗大腸菌 β -ガラクトシダーゼポリクローナル抗体 (ウサギ、5 prime \rightarrow 3 prime, Inc.) を $8.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度にそれぞれ 2%正常ヤギ血清を含む PBS で希釈した溶液を使用し、 37°C で 30 分間反応させる。一次抗体反応後、細胞を PBS で 5 分間 3 回洗浄した後に 2 次抗体との反応を行なう。2 次抗体としては EGFP を導入したラット脳細胞に対しては、Texus Red でラベルした抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (ヤギ、EY LABORATORIES, INC.) を $10 \mu\text{g/ml}$ か、あるいは

Alexa568 でラベルした抗マウス IgG ポリクローナル抗体（ヤギ、Molecular Probes, Inc.）を $4\mu\text{g/ml}$ の濃度にそれぞれ 2% 正常ヤギ血清を含む PBS で希釈した溶液を使用する。また、 β -ガラクトシダーゼ導入ラット脳細胞に対しては Alexa488 でラベルした抗マウス IgG ポリクローナル抗体（ヤギ、Molecular Probes, Inc.）と Alexa568 でラベルした抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体（ヤギ、Molecular Probes, Inc.）をそれぞれ $4\mu\text{g/ml}$ の濃度に 2% 正常ヤギ血清を含む PBS で希釈した溶液を使用し、ラット脳細胞以外の β -ガラクトシダーゼ導入細胞に対しては Alexa568 でラベルしたヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を $4\mu\text{g/ml}$ の濃度に 2% 正常ヤギ血清を含む PBS で希釈した溶液を使用する。2次抗体との反応は、すべて 37°C で 30 分間の条件で行なう。2次抗体反応後に標的細胞を PBS で 5 分間 3 回洗浄した後、PBS を重層して倒立顕微鏡（DMIRB(SLR)、ライカ）により蛍光を観察する事で目的のタンパク質の発現を検出する。

産業上の利用の可能性

本発明により、RRE 配列の利用により 2 つの外來遺伝子を発現することができ、ベクターが提供された。本発明のベクターにおいては、RRE 配列の改変により、2 つの外來遺伝子の発現の量比を調整することが可能である。また、ウイルス由来の発現制御配列を他の発現制御配列に改変することにより、ウイルス由来のタンパク質に対する依存性が解消されている。パッケージングシグナルを有する最小限の領域をベクターに用いることにより、遺伝子組換えによる野生株の出現の危険を減少させ安全性が高められている。本発明のベクターは、遺伝子治療などに好適に用いられる。

請求の範囲

1. 2つの外来遺伝子を発現させるための下記 (a) から (f) ;

- (a) 発現制御配列、
- (b) スプライシング供与配列、
- (c) 第一の外来遺伝子挿入部位、
- (d) RRE コア配列、
- (e) スプライシング受容配列、
- (f) 第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を 5' 側から 3' 側に向けて順に含むベクターDNA。

2. 2つの外来遺伝子を発現させるための下記 (a) から (f) ;

- (a) 発現制御配列、
- (b) スプライシング供与配列、
- (c) RRE コア配列、
- (d) 第一の外来遺伝子挿入部位、
- (e) スプライシング受容配列、
- (f) 第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を 5' 側から 3' 側に向けて順に含むベクターDNA。

3. RRE コア配列がレトロウイルス由来である、請求項 1 または 2 に記載のベクターDNA。

4. RRE コア配列がレンチウイルス由来である、請求項 1 または 2 に記載のベクターDNA。

5. RRE コア配列が免疫不全ウイルス由来である、請求項 1 または 2 に記載のベクターDNA。

6. 発現制御配列が LTR である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載のベクターDNA。

7. 発現制御配列が LTR 以外の発現制御配列を含む配列である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のベクターDNA。
8. LTR 以外の発現制御配列が、CMV プロモーター、CMV プロモーター、および EF1 α プロモーターからなる群より選択される、請求項 7 に記載のベクターDNA。
9. スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレトロウイルス由来である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のベクターDNA。
10. スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレンチウイルス由来である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のベクターDNA。
11. スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列が免疫不全ウイルス由来である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のベクターDNA。
12. ベクターDNA 上の転写されうる領域内にパッケージングシグナルを含む、請求項 1 から 11 のいずれかに記載のベクターDNA。
13. パッケージングシグナルがレトロウイルス由来である、請求項 12 に記載のベクターDNA。
14. パッケージングシグナルがレンチウイルス由来である、請求項 12 に記載のベクターDNA。
15. パッケージングシグナルが免疫不全ウイルス由来である、請求項 12 に記載のベクターDNA。
16. 完全な gag タンパク質が発現しないように構築されている請求項 13 から 15 のいずれかに記載のベクターDNA。
17. gag タンパク質の翻訳開始コドンに変異を有する、請求項 13 から 16 のいずれかに記載のベクターDNA。
18. 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された、請求項 1 から 17 のいずれかに記載のベクターDNA。
19. 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項 12 から

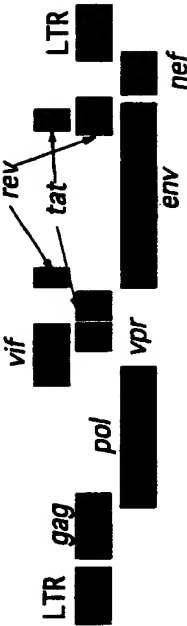
17のいずれかに記載のベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含むレトロウイルスベクター。

20. 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項12から17のいずれかに記載のベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含むレンチウイルスベクター。

21. 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項12から17のいずれかに記載のベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含む免疫不全ウイルスベクター。

22. 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項12から17のいずれかに記載のベクターDNAをパッケージング細胞に導入し、該細胞の培養上清から生産させたウイルス粒子を回収する工程を含む、ウイルスベクターの調製方法。

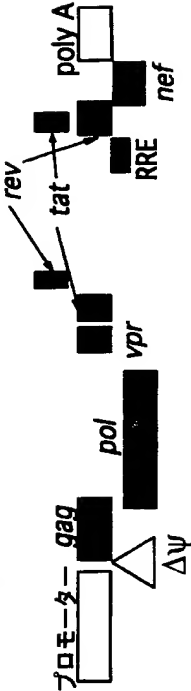
図 1



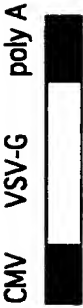
SIV ゲノム



ジーントランスファベクター



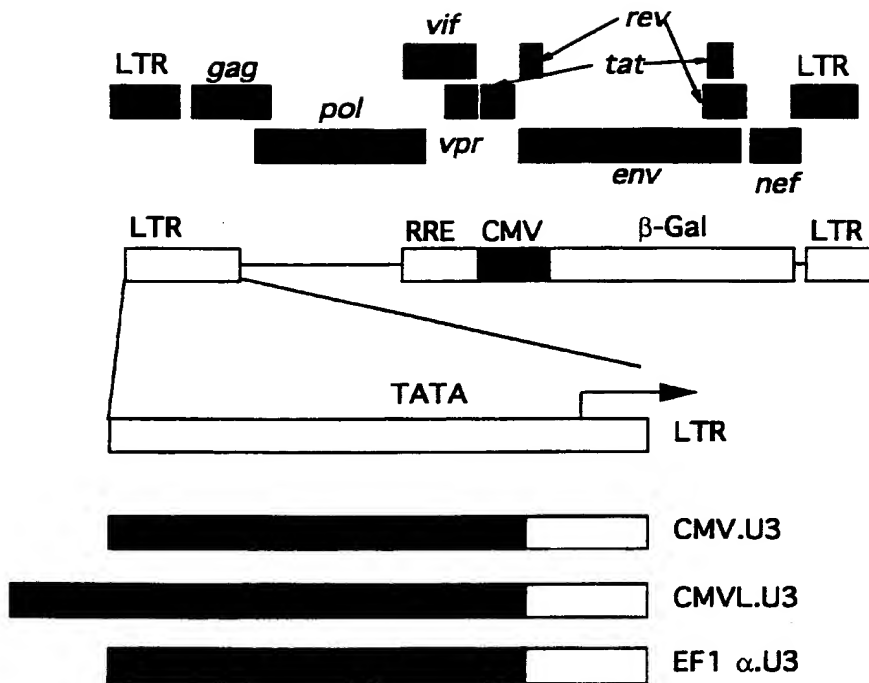
パッケージングベクター



Envコードプラスミド

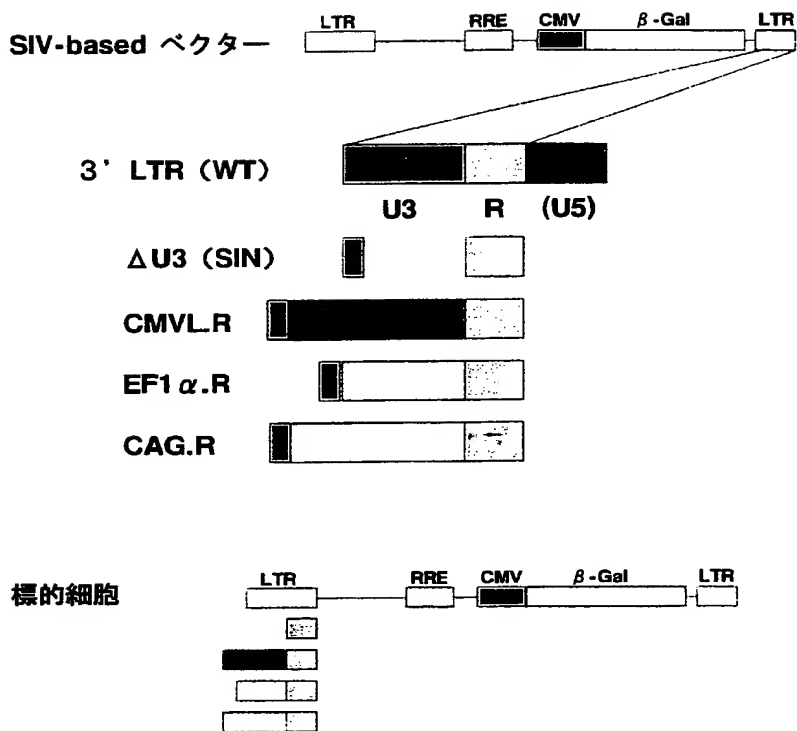
2 / 17

2



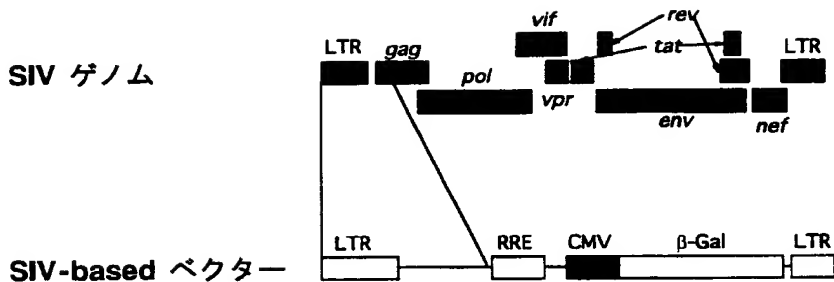
3/17

図 3



4 / 17

図 4



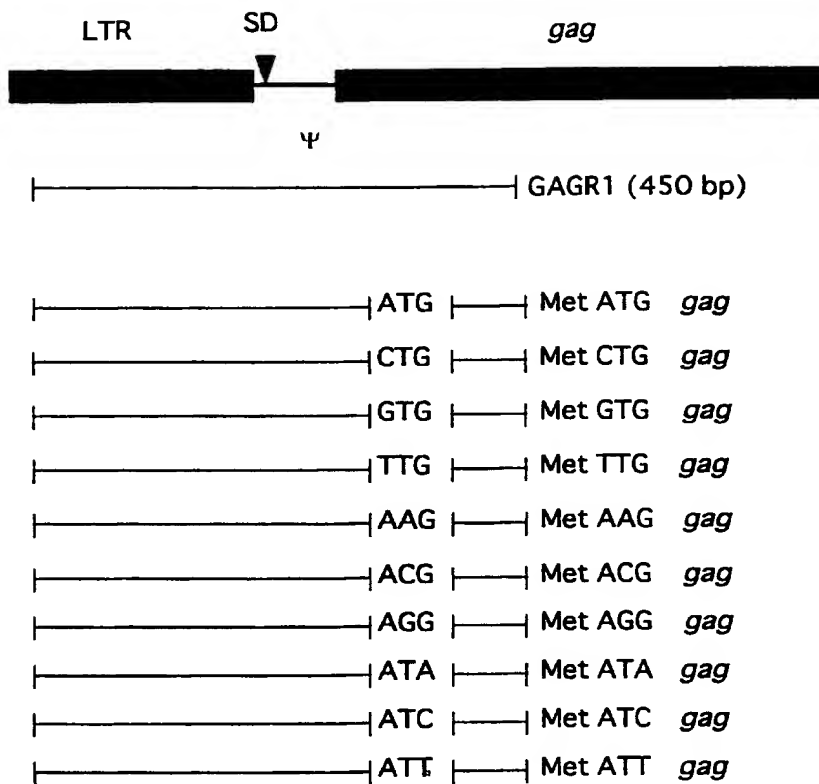
種々の長さのLTR-*gag*領域のDNA断片を含むベクター



β-ガラクトシダーゼアッセイでパッケージングを検討

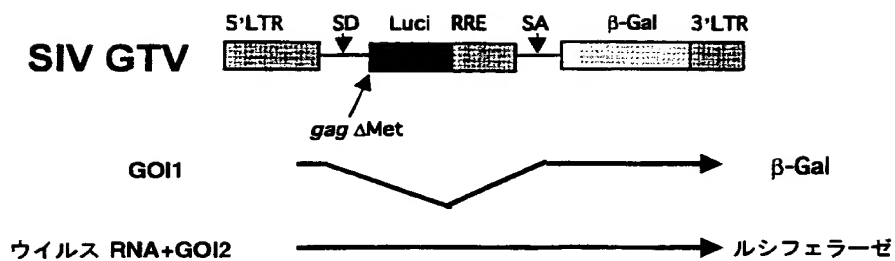
5 / 17

図 5



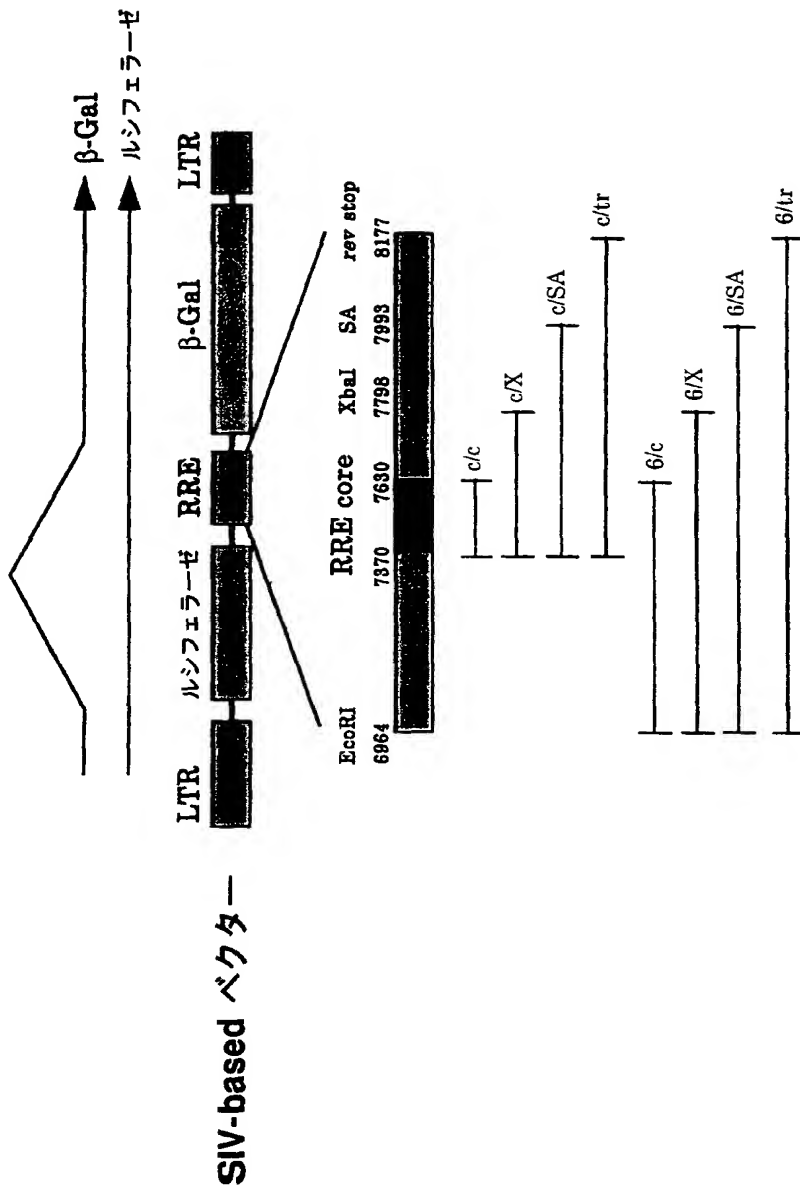
6 / 17

図 6



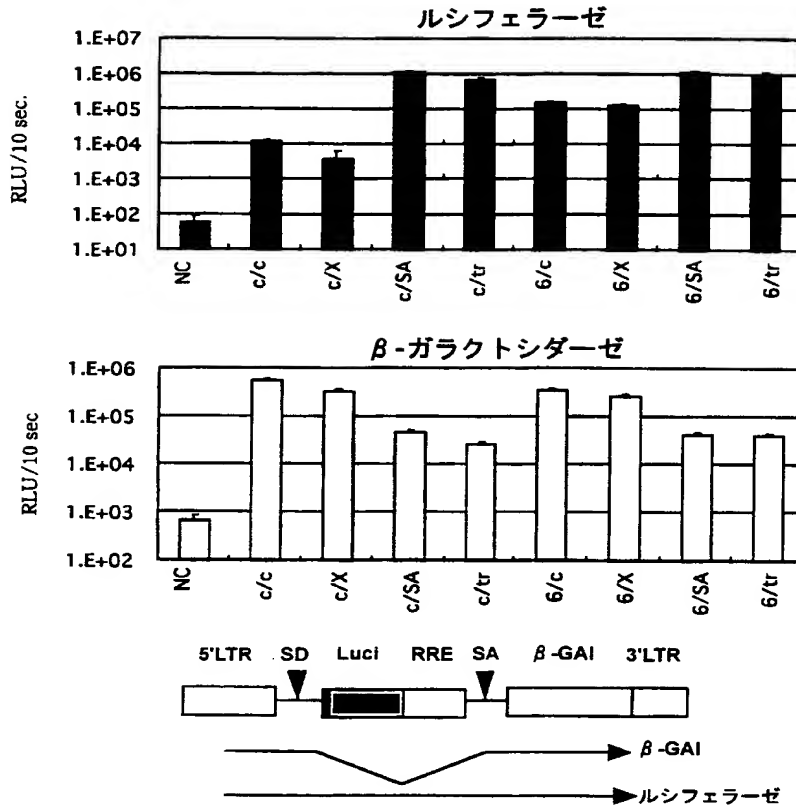
7 / 17

図 7



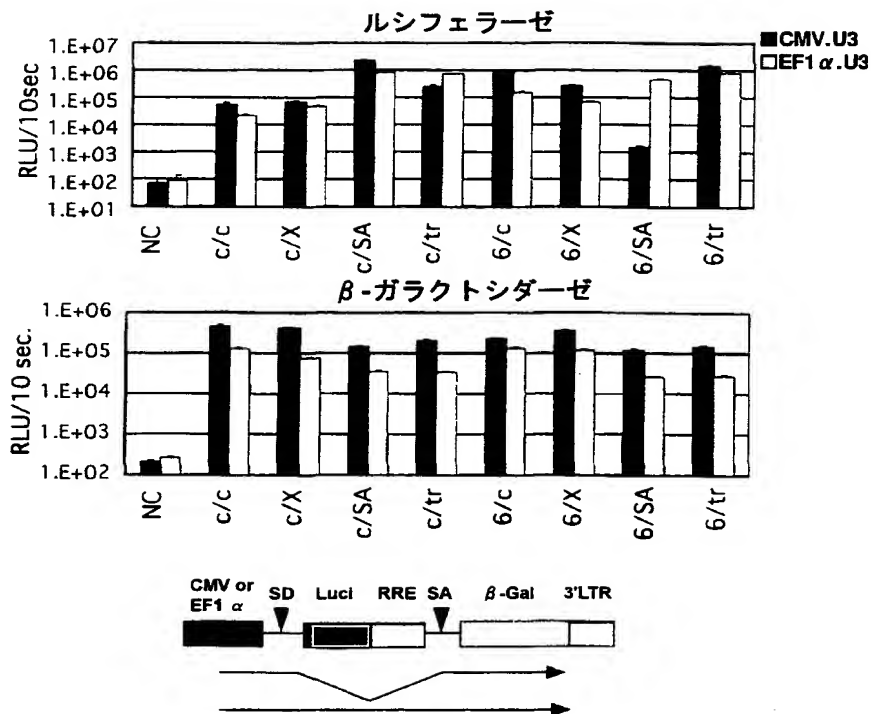
8/17

図 8



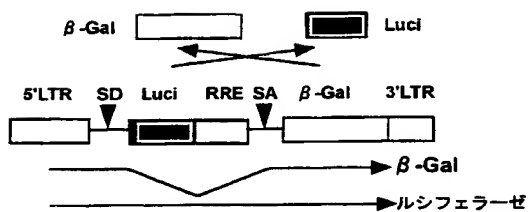
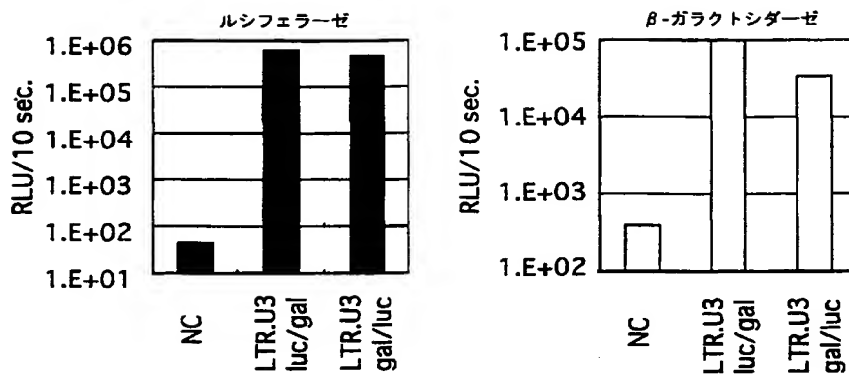
9 / 17

図 9



10/17

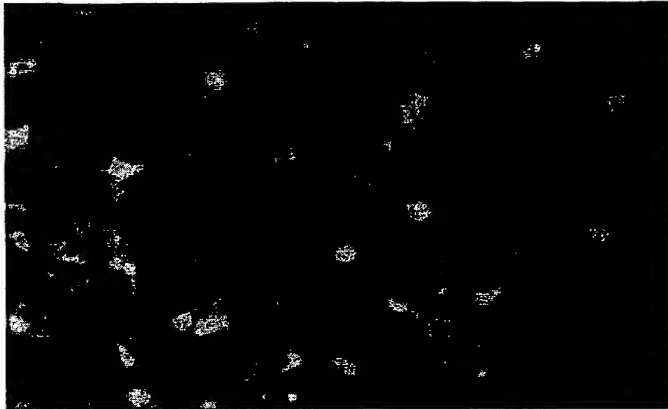
図 10



11/17

図 11

A

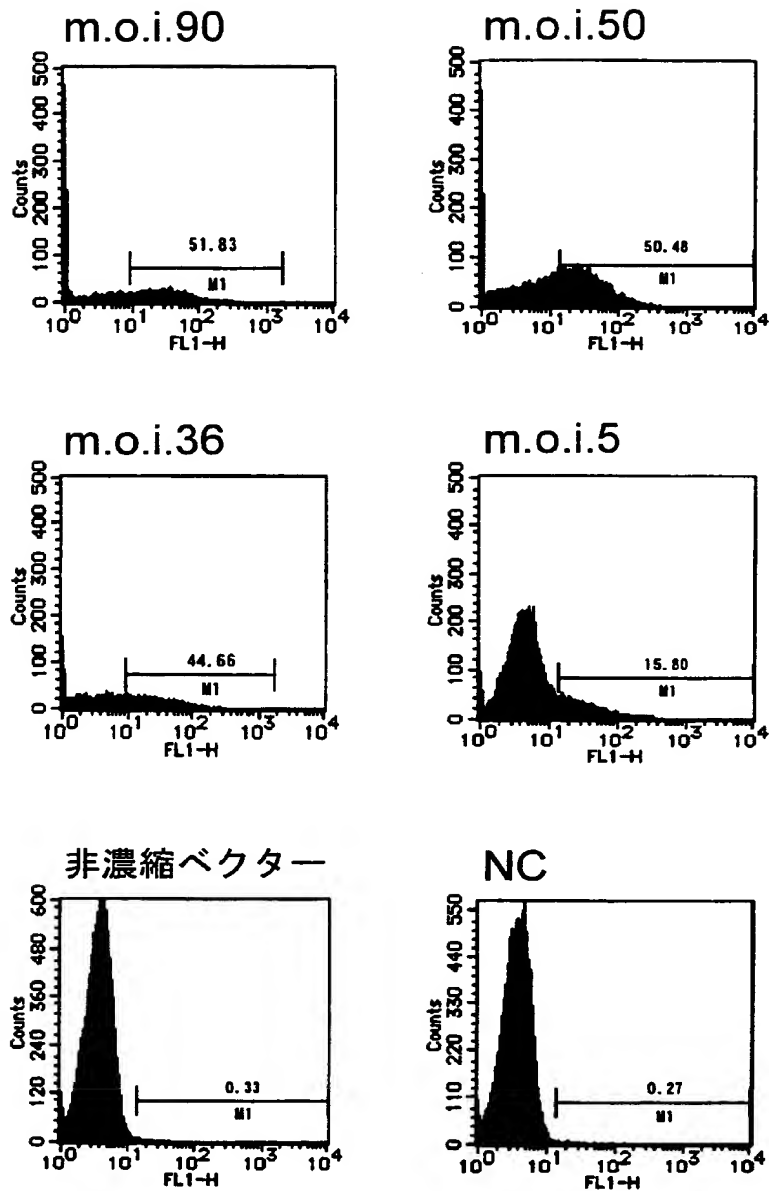


B



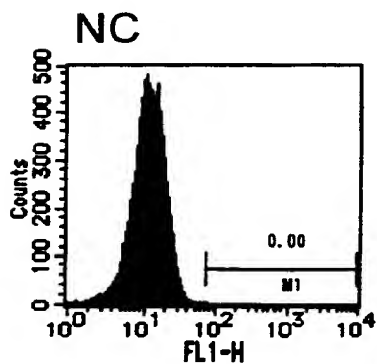
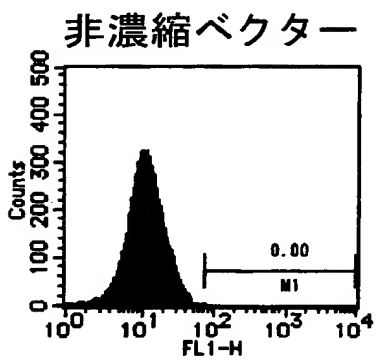
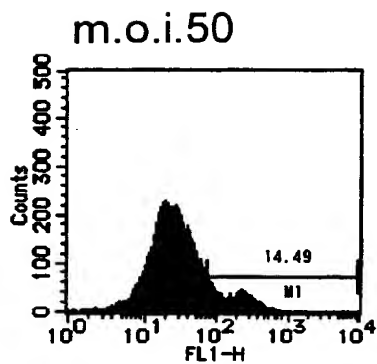
12/17

図 12



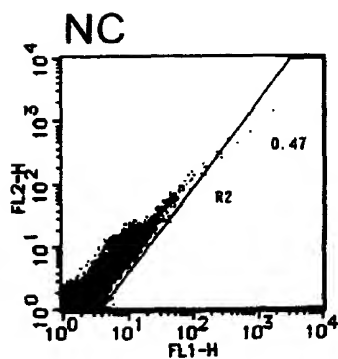
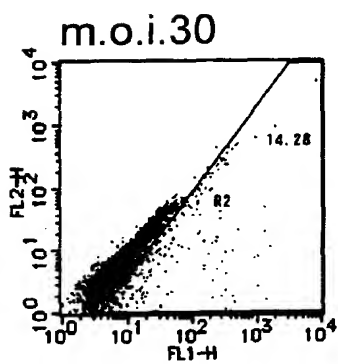
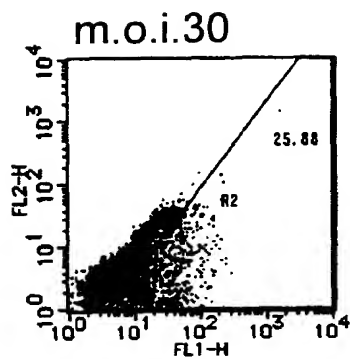
13/17

図 13



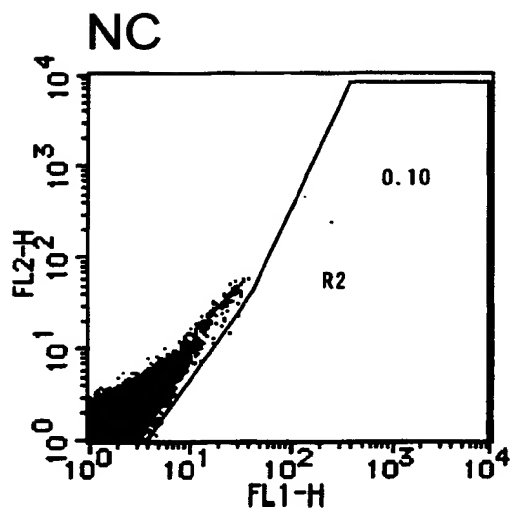
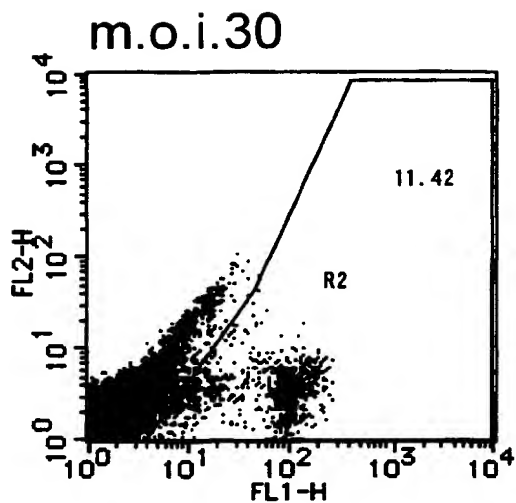
14/17

図 14



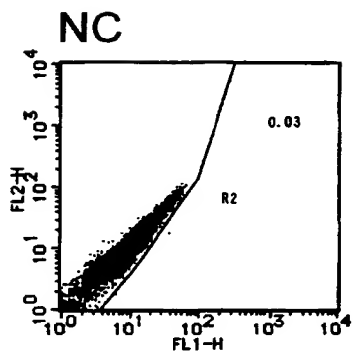
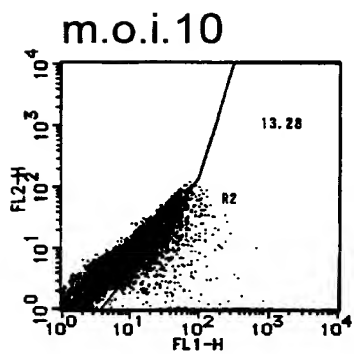
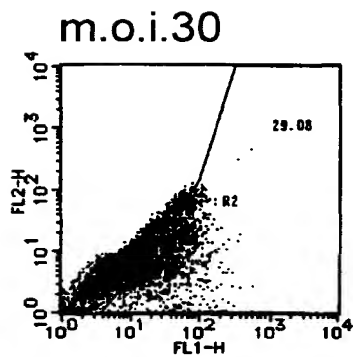
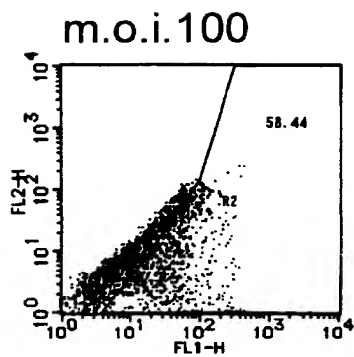
15/17

15



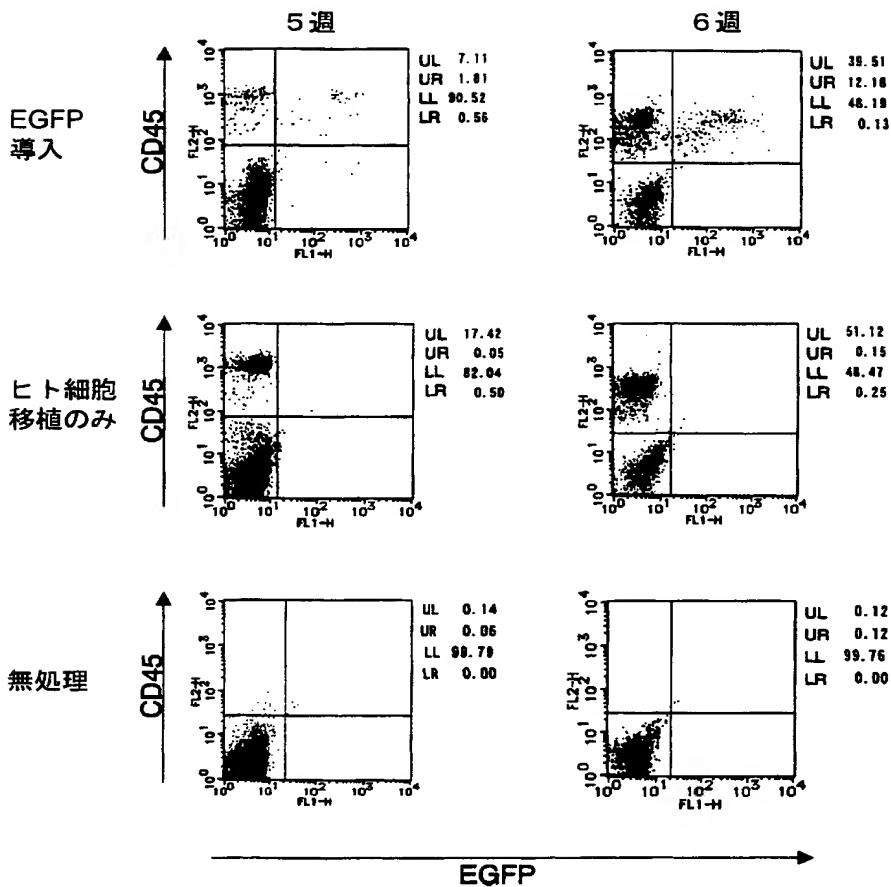
16/17

図 16



17/17

図 17



1/42

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Vector for expressing two exogenous genes

<130> D3-008PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-175646

<151> 1999-06-22

<160> 76

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

2/42

<400> 1

gcagatctca accaggaggc gaggctgcat tttggg

36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

gcgaattcta cttactggtg ctgtaaagga gccaaa

36

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

3/42

atcggaattc ttttattgta agatggattg gtttttaaatt 40

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

cgggatccgc ggccgcggat atggatctgt ggagatagag gaacatat 48

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

tcgagactag tgacttgggtg agtaggctt 29

4

5

6

7

8

9

4/42

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tcgaaagcct actcaccaag tcactactc

29

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 7

aatttctcga gcggccgca

19

<210> 8

<211> 19

5/42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 8

aatttgcggc cgctcgaga

19

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

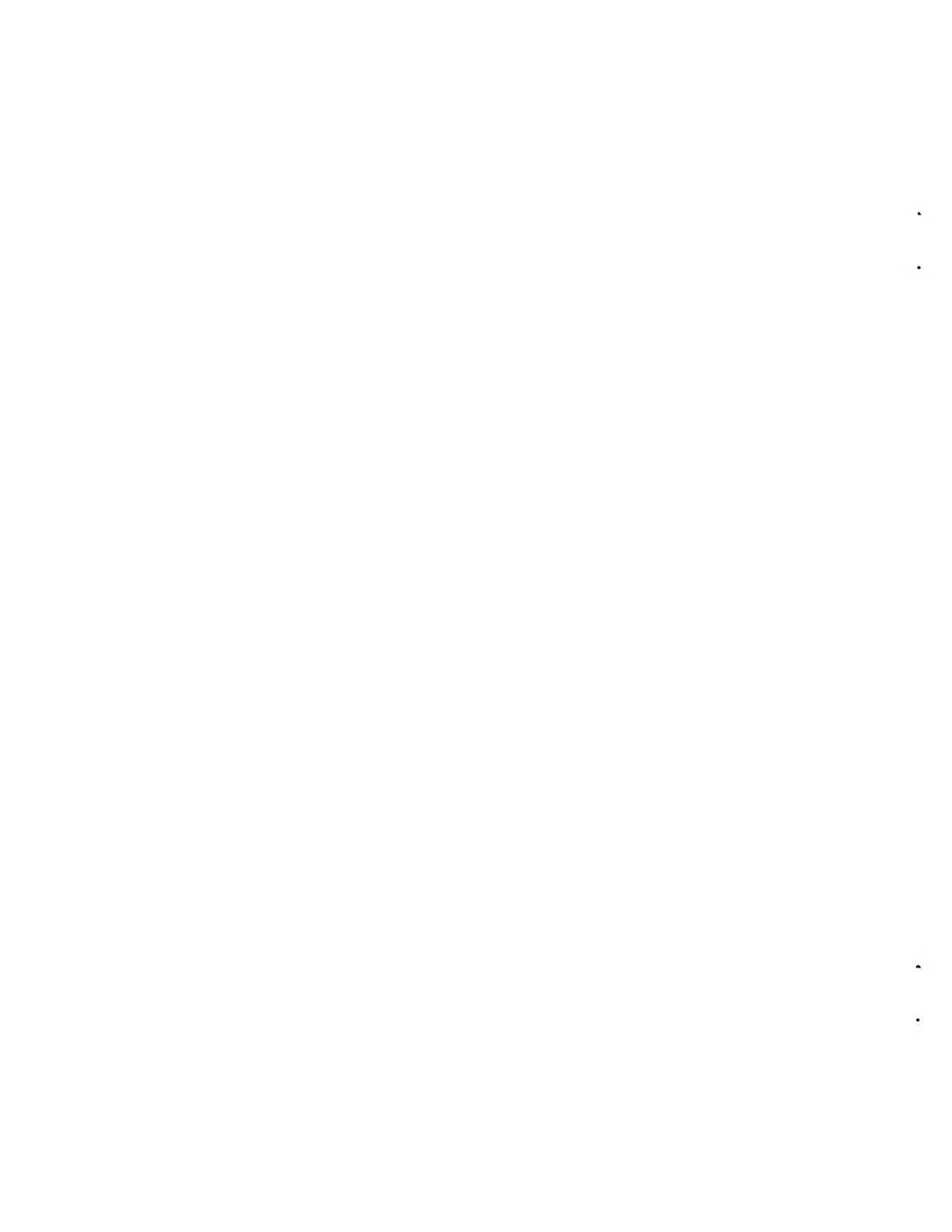
35

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



6/42

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc

40

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

gcgaattccc gtttgtgcta gggttcttag gcttct

36

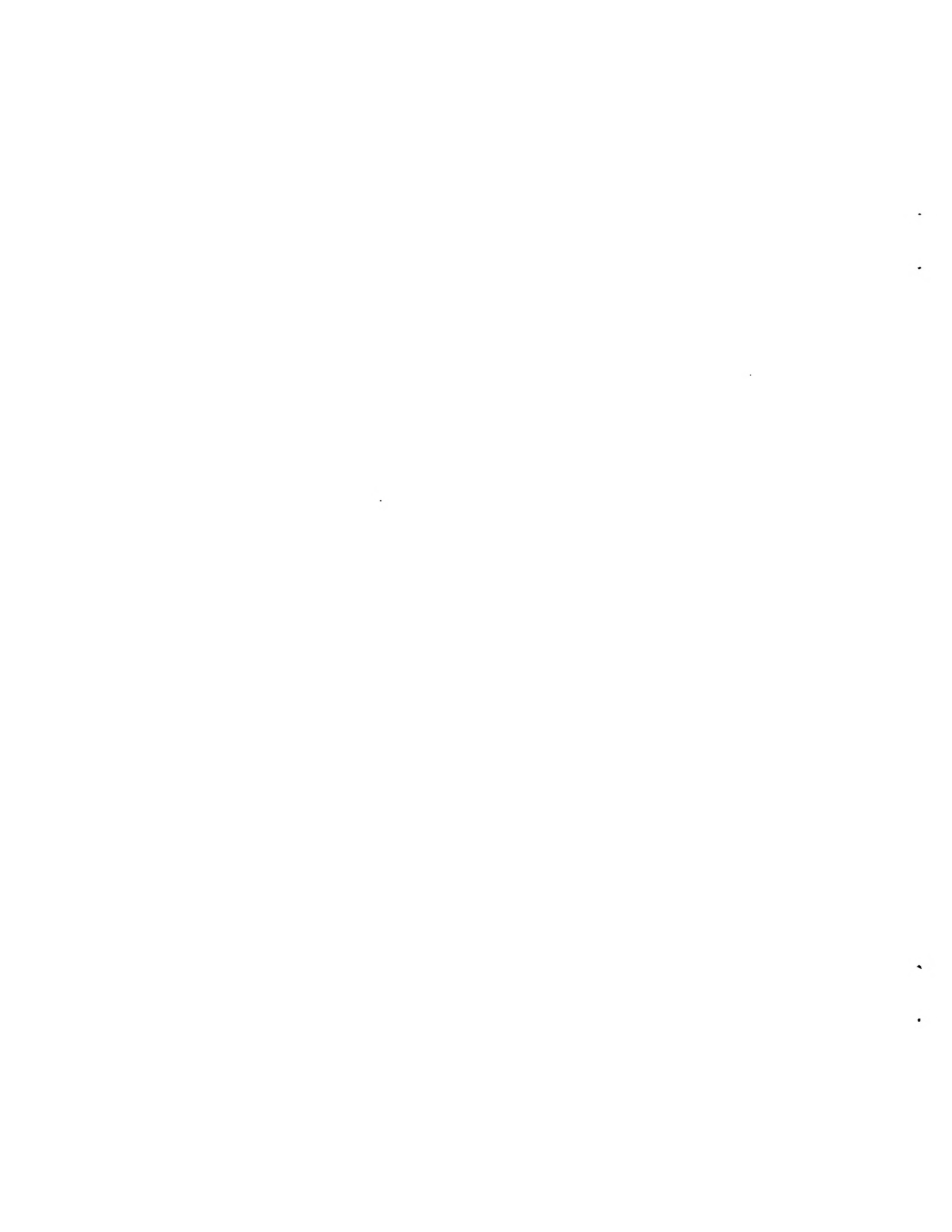
<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



7/42

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

tccccgcgga tatggatctg tggagataga ggaacatatc

40

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gcgcggccgc ggatccgtcg acgcactttt taaaagaaaa ggga

44

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence



8/42

<400> 14

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc tttcta

36

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 15

ggaattcccg cggtagttat taatagtaat caattacggg

40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 16

9/42

cgggatccgc ggccgcttac ttgtacagct cgtccatgcc

40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

atcggaattc ttttattgta agatggattg gtttttaa

40

<210> 18

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

ataagaatgc ggccgctagc taagctgaat gaggagggtc aggcaactgt

50

10/42

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

gcgaattccc gttgtgcta gggttcttag gcttct

36

<210> 20

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

agctagctag gctagcggat atggatctgt ggagatagag gaacatat

48

<210> 21

<211> 35

11/42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

35

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

gcgaattcac tcaagtcct gttcgggcgc cactgc

36

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

12/42

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

gcgaattcaa gcctactcac caagtctcct tcttgg

36

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

gcgaattcgc cccattgcg tacccaccgc ctgccctact

40

<210> 25

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

13/42

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 25

ggaattcccg ggtcggacgg atccattaaa tgtttaattt ggtacttttt ctttcg 57

<210> 26

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 26

cggaattcac gcacacaaga ttgaacagac tttttaagcc 40

<210> 27

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

14/42

<400> 27

cggaattcac aacctctcat ggaggccgaa gcgtccatc

40

<210> 28

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 28

gcgaattccc caggcatttc ctgtgtgttg cgctggaaaa

40

<210> 29

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 29

15/42

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc

40

<210> 30

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 30

gcgaattctg cttcttcatt aatgatctct ttcactattt

40

<210> 31

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 31

cggaattctt tgacacactt ttgaagtcct agaataatcc

40

16/42

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 32

cggaattcgt ggggtgcatt cctaggccct tcaggatgac

40

<210> 33

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 33

cggaattcctt ttccttggtt ccggacattg tctttgcata

40

<210> 34

<211> 40

17/42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 34

gcgaattcgc tcagcactaa ataggagaca attagaccaa

40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 35

gcgaattccc caggcatttc cttgttggtg cgctggaaaa

40

<210> 36

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

18/42

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 36

gcgaattcgc cccaatgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 37

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 37

gcgaattcgc cccagtgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 38

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

19/42

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 38

gcgaattcgc ccccaactgcg tacccaccgc ctgccctact

40

<210> 39

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 39

gcgaattcgc cccctttgcg tacccaccgc ctgccctact

40

<210> 40

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

20/42

<400> 40

gcgaattgcg ccccgttgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 41

gcgaattgcg ccccgttgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 42

21/42

gcgaattcgc cccaattgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 43

gcgaattcgc cccgattgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 44

gcgaattcgc ccctattgcg taccaccgc ctgccctact

40

22/42

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 45

tatataagca gagctcgctg gcttgtaact cagtctctt

39

<210> 46

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 46

tatataagt cagtacgctg gcttgtaact cagtctctta

40

<210> 47

<211> 40

23/42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 47

tataaaaagc gaagccgctg gcttgtaact cagtctctta

40

<210> 48

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 48

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc

40

<210> 49

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

24/42

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 49

cgggggtacct caatattggc cattagccat attattcatt

40

<210> 50

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 50

agttacaagc cagcgagctc tgcttatata gacctccac

40

<210> 51

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25/42

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 51

gcggtaccta gttattaata gtaatcaatt acggg

35

<210> 52

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 52

agttacaagc cagcgagctc tgcttatata gacctccac

40

<210> 53

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

26/42

<400> 53

gcggtaccag gctccccagc aggcagaagt atgca

35

<210> 54

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 54

agttacaagc cagcgtactg cacttatata cggttctccc

40

<210> 55

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 55

27/42

ggggtacat tgattattga ctagttatta atagtaatca

40

<210> 56

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 56

agttacaagc cagcggttc gctttttata gggccgccgc

40

<210> 57

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 57

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaaag aaaaggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggac gctggcttgt aactcagtct cttagtagg 99

28/42

<210> 58

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 58

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc ttctta

36

<210> 59

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 59

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaag aaaaggagg actggatggg atttattact 60

ccgataggat caatattggc cattagccat attattcat

99

29/42

<210> 60

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 60

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaag aaaaggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggaa ggctcccag caggcagaag tatgcaaag 99

<210> 61

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 61

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaag aaaaggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggac attgattatt gactagttat taatagtaa 99

30/42

<210> 62

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 62

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc tttcta

36

<210> 63

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 63

atcggaattc gccgccatgg aagacgcaa aaacataaag aaaggc

46

<210> 64

<211> 40

31/42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 64

atcggaattc ttacacggcg atctttccgc cttcttggc

40

<210> 65

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 65

atcggaattc gccgccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcacc

46

<210> 66

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

32/42

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 66

atcggaattc ttacttgtag agctcgtcca tgccgagagt

40

<210> 67

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 67

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

35

<210> 68

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

33/42

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 68

gcgaattcgc ccccgctgcg taccaccgc ctgccc

36

<210> 69

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 69

atcggaattc ttttattgta agatggattg gtttttaa

40

<210> 70

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

34/42

<400> 70

gcgaattccc gtttgtgcta gggttccttag gcttct

36

<210> 71

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 71

gctctagacc cccaggagtt tagtcgtgcc tgatcctcta

40

<210> 72

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 72

35/42

agctagctag gctagcggat atggatctgt ggagatagag gaacatat

48

<210> 73

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 73

ataagaatgc ggccgctagc taagctgaat gaggagggtc aggcaactgt

50

<210> 74

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 74

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

35

36/42

<210> 75

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 75

gcgaattctg cttcttcatt aatgatctct ttcactattt

40

<210> 76

<211> 9170

<212> DNA

<213> Simian immunodeficiency virus

<400> 76

cagtctctta ctaggagacc agcttgagcc tgggtgttcg ctggttagcc taacctggtt	60
ggccaccagg ggtaaggact ccttggtcta gaaagctaat aaacttgccct gcattagagc	120
ttatctgagt caagtgcct cattgacgcc tcactctctt gaacgggaat cttccttact	180
gggttctctc tctgaccag gcgagagaaa ctccagcagt ggcgcccgaa cagggacttg	240
agtgagagtg taggcacgta cagctgagaa ggcgtcggac gcgaaggaag cgcggggtgc	300
gacgcgacca agaaggagac ttggtgagta ggcttctcga gtgccgggaa aaagctcgag	360
cctagttaga ggactaggag aggccgtagc cgtaactact ctgggcaagt agggcaggcg	420
gtgggtacgc aatgggggcg gctacctcag cactaaatag gagacaatta gaccaatttg	480

37/42

agaaaaatacg acttcgcccc aacggaaaaga aaaagtacca aattaaacat ttaatatggg 540
caggcaagga gatggagcgc ttcggcctcc atgagagggt gttggagaca gaggaggggt 600
gtaaaagaat catagaagtc ctctaccccc tagaaccaac aggatcggag ggcttaaaaa 660
gtctgttcaa tcttgtgtgc gtactatatt gcttgacaaa ggaacagaaa gtgaaagaca 720
cagaggaagc agtagcaaca gtaagacaac actgccatct agtggaaaaa gaaaaaagtg 780
caacagagac atctagtggg caaaagaaaa atgacaaggg aatagcagcg ccacctgggt 840
gcagtcagaa ttttcagcg caacaacaag gaaatgcctg ggtacatgta cccttgtcac 900
cgcgcacctt aaatgcgttg gtaaaagcag tagaggagaa aaaatttggg gcagaaatag 960
tacctatgtt tcaagcccta tcagaaggct gcacacccta tgacattaat cagatgctta 1020
atgtgctagg agatcatcaa ggggcattac aaatagtga agagatcatt aatgaagaag 1080
cagcccagtg gtagtgaaca caccactac ccgcaggacc cctaccagca ggacagctca 1140
gggaccctcg cggtcagat atagcaggga ccaccagctc agtacaagaa cagttagaat 1200
ggatctatac tgctaacccc cgggtagatg taggtgcat ctaccggaga tggattattc 1260
taggacttca aaagtgtgtc aaaatgtaca acccagtatc agtcctagac attaggcagg 1320
gacctaaaga gcccttcaag gattatgttg acagatttta caaggcaatt agagcagaac 1380
aagcctcagg ggaagtgaac caatggatga cagaatcatt actcattcaa aatgctaac 1440
cagattgtaa ggtcactctg aaggcctag gaatgcacc cacccttgaa gaaatgttaa 1500
cggcttgta cggggtagga ggcccaagct acaaagcaaa agtaatggca gaaatgatgc 1560
agaccatgca aatcaaaaac atggtgcagc agggaggtcc aaaaagacaa agacccccac 1620
taagatgtta taattgtgga aaatttggcc atatgcaaag acaatgtccg gaaccaagga 1680
aaacaaaatg tctaaagtgt ggaaaattgg gacacctagc aaaagactgc aggggacagg 1740
tgaatttttt agggtagtga cgggtgatgg gggcaaaacc gagaaatttt cccgccgcta 1800
ctcttggagc ggaaccgagt gcgcctctc caccgagcgg caccacccca tacgaccag 1860
caaagaagct cctgcagcaa tatgcagaga aagggaaca actgagggag caaaagagga 1920
atccaccggc aatgaatccg gattggaccg agggatattc ttgaactcc ctcttggag 1980
aagaccaata aagacagtgt atatagaagg ggtcccatc aaggcactgc tagacacagg 2040

ggcagatgac accataatta aagaaaatga ttacaatta tcaggtccat ggagacccaa 2100
aattataggg ggcataggag gaggccttaa tgtaaaagaa tataacgaca gggaagtaaa 2160
aatagaagat aaaattttga gaggaacaat attgttagga gcaactccca ttaatataat 2220
aggtagaaat ttgctggccc cggcagtgcc cgggttagta atgggacaat tatcagaaaa 2280
aattcctgtc acacctgtca aattgaagga aggggctcgg ggacctgtg taagacaatg 2340
gcctctctct aaagagaaga ttgaagcttt acaggaaata tgttcccaat tagagcagga 2400
aggaaaaatc agtagagtag gaggagaaaa tgcatacaat accccaatat ttgcataaa 2460
gaagaaggac aaatcccagt ggaggatgct agtagacttt agagagttaa ataaggcaac 2520
ccaagatttc ttggaagtgc aattagggat accccaccca gcaggattaa gaaagatgag 2580
acagataaca gttttagatg taggagacgc ctattattcc ataccattgg atccaaattt 2640
taggaaatat actgctttta ctattctac agtgaataat cagggacccg ggattaggt 2700
tcaattcaac tgtctccgc aagggtgga aggatctctt acaatcttcc aaaatacagc 2760
agcatccatt ttggaggaga taaaaagaaa ctggccagca ctaaccattg tacaatacat 2820
ggatgattta tgggtaggtt ctcaagaaaa tgaacacacc catgacaaat tagtagaaca 2880
gttaagaaca aaattacaag cctggggctt agaaccacca gaaaagaaga tgcaaaaaga 2940
accaccttat gagtggatgg gatacaaact ttggcctcac aaatgggaac taagcagaat 3000
acaactggag gaaaaagatg aatggactgt caatgacatc cagaagttag ttgggaaact 3060
aaattgggca gcacaattgt atccaggtct taagacaaga atatgcaagt taattacagg 3120
aggaaagaaa aatctgttag agctagtagc ttggacacct gaggcagaag ctgaatatgc 3180
agaaaatgca gagattctta aaacagaaca ggaaggaacc tattacaaac caggaatacc 3240
tattagggca gcagtacaga aattggaagg aggacagtgg agttaccaat tcaacaaga 3300
aggacaagtc ttgaaagtag gaaaatacac caagcaaaag aacaccata caaatgaact 3360
tcgcacatta gctggttttag tgcagaagat ttgcaagaa gctctagtta tttgggggat 3420
attaccagtt ctagaactcc cgatagaaag agaggtatgg gagcaatggg gggcggatta 3480
ctggcaggt 3540
atggtacaca ttaacaaaag aaccataacc caaggaggac gtttactatg taggagcatg 3600

39/42

caacagaaat tcaaaagaag gaaaagcagg atacatctca caatacggaa aacagagagt	3660
agaacatta gaaaacacta ccaatcagca agcaaaatta acagctataa aaatggcttt	3720
ggaagacagt gggcctaagt tgaacatagt aacagactct caatatgcaa tgggaatfff	3780
gacagcacia cccacacaaa gtgattcacc attagtagag caaattatag ccttaatgat	3840
acaaaagcaa caaatatatt tgcagtgggt accagcacat aaaggaatag gaggaatga	3900
ggagatagat aaattagtga gtaaaggcat tagaagagtt ttattcttag aaaaaataga	3960
agaagctcaa gaaaagcatg aaagatatca taataattgg aaaaacctag cagatacata	4020
tgggcttcca caaatagtag caaaagagat agtggccatg tgtccaaaat gtcaataaa	4080
gggagaacca gtgcatggac aagtggatgc ctacacctga acatggcaga tggattgtac	4140
tcatctagaa aaaaaagtag tcatagttgc ggtccatgta gccagtggat tcatagaagc	4200
agaagtcata cctagggaaa caggaagaaga aacggcaag tttctattaa aaactactag	4260
tagatggcct ataacacagt tacacacaga caatgggcct aactttacct cccaagaagt	4320
ggcagcaata tgttggtggg gaaaaattga acatacaaca ggtataccat ataacccca	4380
atctcaagga tcaatagaaa gcatgaacaa gcaattaaaa gagataattg ggaaataag	4440
agatgattgc caatatacag aggcagcagt actgatggct tgcatacttc acaattttaa	4500
aagaaaggga ggaatagggg gacagacttc agcagagaga ctaattaata taataacaac	4560
acaattagaa atacaacatt tacaaccaa aattcaaaaa attttaaatt ttagagtcta	4620
ctacagagaa gggagagacc ctgtgtggaa aggaccggca caattaatct ggaaaggga	4680
aggagcagtg gtcctcaagg acggaagtga cctaaagggt gtaccaagaa ggaaagctaa	4740
aattattaag gattatgaac ccaaacaaag agtgggtaat gaggtgacg tggaaagtac	4800
caggggatct gataactaaa tggcagggaa tagtcagata ttggatgaga caaagaaatt	4860
tgaatggaa ctattatatg cattaccaa ttacatgggc ttggtacacc atgagtagat	4920
atgtaatacc aataggaaaa catggggaaa tatgtgtaga cctatatagg catttaacac	4980
cagagcaagg atggctatcc acatatgcag taggtatata atatgtaagc aatttagaat	5040
ctaaatatag aacagaatta gacctgcta cagcagatag tataatacat ggtcactatt	5100
ttaattgttt taaagaaaga gccatccaac aagctctgag gggccacaga tttgtcttct	5160

40/42

gtcagtttcc agaagggcat aaaagcacag gacaggtacc atctttgcag tacctagctc 5220
tgctcgaca tcaaaatggc ctcagggaga gatccaagag aggcaagacc aggagaagta 5280
gaaatttggg atctaagcag ggagccgtgg gacaaatggc taagagatat gttacaagat 5340
ctcaaccagg aggcgaggct gcattttggg agagaactcc tgttccaagt atggaactac 5400
tgtcaggagg aaggagaaag acatggtact cccatgatgg aaagggccta caaatattat 5460
aggctagtac aaaaggctct ctttgtgcat ttctgatgtg ggtgcaggag aaggcagccc 5520
tttgaaccat acgaggagag gagagatgga caagggggag gcagagcaaa tcgtgtccca 5580
ccaggacttg agtgaagact atcagaagcc tctgcagact tgtaaaaata aatgtttttg 5640
caaaaaatgt tgttaccact gtcagctttg ctttctgcaa aaaggcctag gtgttaccta 5700
tcatgccctt aggaccagaa gaaagaagat tcgttcgctt aatttggctc ctttacagca 5760
ccagtaagta tgaggtatac aataataacc ttaggaataa tagtgatagg aatagggata 5820
gtgttaagta agcaatgat aacagtcttt tatggaatac cagtatggaa aaacagctcg 5880
gtgcaggctt tctgcatgac tcccaccaca agcttatggg ctactactaa ttgcatacca 5940
gatgatcatg actatacaga agtacctcta aatatcactg aaccatttga ggcatggggt 6000
gatagaaacc cattaatagc acaagcagcc agtaacatcc atttactctt tgagcaaact 6060
atgaaacctt gtgtgaagtt atcaccacta tgcatacaaga tgaattgtgt agagttaaat 6120
tccacaagag aaagggcgac aacacctaca acgacgccga aatctaccgg cctaccctgt 6180
gtaggcccgga cgtcagggtga aaatctacag tcctgtaatg caagcattat agaaagggag 6240
atggaggatg agccccctc taattgtaca ttcgcaatgg ctggctatgt aagagatcag 6300
aagaaaaatt attattctgt ggtgtggaat gatgcagaaa tctattgcaa aaataagact 6360
aatagcacta gcaaagagtg ttacatgatt cattgtaatg actcagttat aaaagaagca 6420
tgtgacaaaa catattggga tcagttgagg ttaaggtatt gtgctccagc aggttatgct 6480
ttgctaaaaat gtaatgatga agattataat gggataaaac aaaattgctc aaatgtatca 6540
gtagtgcatg gtacaggctt aatgaatata acagtgacaa cagggttggt gctgaatgga 6600
agctatcatg agaatcgaac ccagatatgg cagaaacata gggtaaataa taacacagta 6660
ttgatcttgt tcaacaagca ctataatcta tcagtcacct gtaggagacc aggaacaacg 6720

acagtcctac cggtaacgat aatggcggga ctggttttcc actctcaaaa atacaacatg 6780
aagcttagac aggcttggtg tcacttcgaa ggcaattgga gaggtgcctg gcgggaagta 6840
aaacaaaaaa tagtagagtt accaaaagac aggtataaag gaaccaataa tacagaacac 6900
atatacctgc aaagacaatg gggagaccca gaagcatcca acttgttggt taattgtcaa 6960
ggagaattct tttattgtaa gatggattgg tttttaaatt acttaaataa taaaacatgg 7020
gatgcatacc ataatttttg tagcagcaaa aagaaaggac acgcaccagg accatgtgta 7080
caaaggacgt atgttgctta ccatatcagg tctgtaataa atgattccta taccctatca 7140
aagaaaaactt atgtcccgcc aagagaagga catttgcaat gcagggtccac agtcactggg 7200
atgacagttg agcttaatta taatagtaaa aacagaacca acgtgacact aagtccccag 7260
atagaatcta tctgggcggc tgaattgggc agatacaaat tagtggaat cacaccaatt 7320
ggctttgcac ccacagaagt aaggcggtat acgggaggac atgagaggca aaagagagtc 7380
ccgtttgtgc tagggttctt aggccttctg ggggctgctg gaactgcaat gggagcagcg 7440
gcgagcagcc tgacggtcca gtcccggcat ttgcttgctg ggatactgca gcagcagaag 7500
aatctgctgg cggctgtgga ggctcaacag cagatgttga agctgaccat ttgggggtgtt 7560
aaaaacctca atgcccgcgt cacagccctt gagaagtacc tagaggatca ggcacgacta 7620
aactcctggg ggtgcgcatg gaaacaagta tgtcatacca cagtggagtg gccctggaca 7680
aatcggactc cggattggca aaatatgact tggttggagt gggaaagaca aatagctgat 7740
ttggaaagca acattacggg acaattagtg aaggctagag aacaggagga aaagaatcta 7800
gatgcctatc agaagttaac tagtttggtc gatttctggt cttggttcga tttctcaaaa 7860
tggcttaaca ttttaaaaaa gggattttta gtaatagtag gaataatagg gtttaagatta 7920
ctttacacag tatatggatg tatagtgagg gttaggcagg gatatgttcc tctatctcca 7980
cagatccata tccaccaagt ggggaaggga cggccagaca acgccgacga gccaggagaa 8040
ggtggagaca acagcaggat caaattagag tcttggtaga aagactccaa gagcaggtgt 8100
atgcagttga ccgcctggct gacgaggctc aacacttggc tatacaacag ttgcctgacc 8160
ctcctcattc agcttaggaa agcttttcaa tacctgcaat atgggctcgc agaactcaaa 8220
accggcgcac aagaaatact ccaaactctg gcaggcggtg cacaaaacgc atgtcaccag 8280

42/42

atatggcttg cttgcagatc cgcttatagg aacatcgta acagtccaag aagagtgcga 8340
caaggccttg aggaaatcct taattaggaa acaaatggc aacatgacgg aagaggaaag 8400
gaggcttcaa gaaggagaca cctgggaaga gtggtcggat gatgaggaag aagtgggatt 8460
tccagtgaga ccaagagtac ccttaaggca aatgacttat aaacttgacag tggatttttc 8520
gcacttttta aaagaaaagg gaggactgga tgggatttat tactccgata ggagaaataa 8580
gatcctgaat ctgtatgctc ttaatgaatg ggggataatt gatgattgga atgcctggtc 8640
gaagggacca ggaataagat tccctaaatg ctttgggttc tgctttaagc tagtgccagt 8700
ggacttacat gaggaagcac aaacatgtga aagacattgc ctagtccatc cagcgcagat 8760
gggagaagat ccagatggta tcagccatgg agagatcttg gtgtggaagt ttgatcctat 8820
gttggcaata cagtacgacc ccaatcggga gtactttact gacatgcatg ggctggtgaa 8880
gaggaagtag ccagaccgca agcctgcggt tagaacatca ccatggagat gacattaaaa 8940
actgctgacg ggactttcca gcgaaggac ttccaaggc gggacatggg cggtcggggg 9000
agtggcttta ccctcagagc tgcataaaaag cagatgctcg ctggcttgta actcagtctc 9060
ttactaggag accagcttga gcctgggtgt tcgctggta gcctaacctg gttggccacc 9120
aggggtaagg actccttggc ttagaaagct aataaacttg cctgcattag 9170



.

.

.

.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/867, C12N 5/10, C12N 7/01, C12P 21/02 // A61K 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/867, C12N 5/10, C12N 7/01, C12P 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	NAKAJIMA, T. et al., "Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system", Hum Gene Ther. (01 September, 2000), Vol.5, No.5, pp.277-286	1-22
X	WO, 97/12622, A1 (SALK INST BIOLOGICAL STUDIES), 10 April, 1997 (10.04.97) & AU, 9671681, A & ZA, 9608382, A & EP, 871459, A1 & JP, 11-512615, W & US, 6013516, A	1-22
X	DULL, T. et al., "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system", J. Virol. (1998), Vol.72, No.11, pp.8463-8471	1-22
X	ZUFFEREY, R. et al., "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery", J. Virol. (1998), Vol.72, No.12, pp.9873-9880	1-22
P, X	WO, 00/29421, A1 (CELL GENESYS INC.), 25 May, 2000 (25.05.00)	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 September, 2000 (21.09.00)Date of mailing of the international search report
03 October, 2000 (03.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03955

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& AU, 200019053, A	
P, X	WO, 00/29557, A1 (CELL GENESYS INC.), 25 May, 2000 (25.05.00) & AU, 200019052, A	1-22
P, X	WO, 99/31251, A1 (CELL GENESYS INC.), 24 June, 1999 (24.06.99) & AU, 9918034, A & US, 5994136, A	1-22
P, A	WO, 00/00600, A2 (CHANG L.), 06 January, 2000 (06.01.00) & AU, 9943126, A	1-22
P, A	CHUI, Y. et al., "Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function", J. Virol. (1999.Jul.), Vol.73, No.7, pp.6171-6176	1-22
P, A	WO, 99/36511, A2 (CHIRON CORP.), 22 July, 1999 (22.07.99) & AU, 9923295, A	1-22
P, A	JOHNSTON, J. C. et al., "Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors", J. Virol. (June, 1999), Vol.73, No.6, pp.4991-5000	1-22
A	GASMI, M. et al., "Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors", J. Virol. (March 1999), Vol.73, No.3, pp.1828-1834	1-22
P, A	WO, 99/50431, A1 (MACFARLANE BURNET CENT. MEDICAL), 07 October, 1999 (07.10.99) & AU, 9931276, A	1-22
A	WO, 92/21750, A1 (US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICE), 10 December, 1992 (10.12.92) & US, 7707055, A & AU, 9220073, A & EP, 588914, A & JP, 6-510181, W	1-22
A	WO, 94/20621, A2 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.), 15 September, 1994 (15.09.94) & AU, 9460063, A & ZA, 9401386, A	1-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/867, C12N 5/10, C12N 7/01, C12P 21/02 // A61K 48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/867, C12N 5/10, C12N 7/01, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), MEDLINE (STN), JICSTファミリ (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	NAKAJIMA, T. et al. "Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system", Hum Gene Ther. (2000. Sep. 1) Vol. 5, No. 5, p. 277-286	1-22
X	WO, 97/12622, A1 (SALK INST BIOLOGICAL STUDIES) 10. 4月. 1997 (10. 04. 97) & AU, 9671681, A & ZA, 9608382, A & EP, 871459, A1 & JP, 11-512615, W & US, 6013516, A	1-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 09. 00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	DULL, T. et al. "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system", J. Virol. (1998) Vol. 72, No. 11, p. 8463-8471	1-22
X	ZUFFEREY, R. et al. "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery", J. Virol. (1998) Vol. 72, No. 12, p. 9873-9880	1-22
P, X	WO, 00/29421, A1 (CELL GENESYS INC.) 25. 5月. 2000 (25. 05. 00) & AU, 200019053, A	1-22
P, X	WO, 00/29557, A1 (CELL GENESYS INC.) 25. 5月. 2000 (25. 05. 00) & AU, 200019052, A	1-22
P, X	WO, 99/31251, A1 (CELL GENESYS INC.) 24. 6月. 1999 (24. 06. 99) & AU, 9918034, A & US, 5994136, A	1-22
P, A	WO, 00/00600, A2 (CHANG L.) 6. 1月. 2000 (06. 01. 00) & AU, 9943126, A	1-22
P, A	CHUI, Y. et al. "Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function", J. Virol. (1999. Jul.) Vol. 73, No. 7, p. 6171-6176	1-22
P, A	WO, 99/36511, A2 (CHIRON CORP.) 22. 7月. 1999 (22. 07. 99) & AU, 9923295, A	1-22
P, A	JOHNSTON, J. C. et al. "Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors", J. Virol. (1999. Jun.) Vol. 73, No. 6, p. 4991-5000	1-22
A	GASMI, M. et al. "Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors", J. Virol. (1999. Mar.) Vol. 73, No. 3, p. 1828-1834	1-22
P, A	WO, 99/50431, A1 (MACFARLANE BURNET CENT. MEDICAL) 7. 10月. 1999 (07. 10. 99) & AU, 9931276, A	1-22
A	WO, 92/21750, A1 (US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICE) 10. 12月. 1992 (10. 12. 92) & US, 7707055, A & AU, 9220073, A & EP, 588914, A & JP, 6-510181, W	1-22
A	WO, 94/20621, A2 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.) 15. 9月. 1994 (15. 09. 94) & AU, 9460063, A & ZA, 9401386, A	1-22